

抗癌剤・抗神経変性剤・味覚変換剤開発のための基礎研究

中谷 一泰¹⁾Basic Studies for the Development of Anticancer, Antidementia,
and Taste Modifier DrugsKazuyasu NAKAYA¹⁾*School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8 Hatanodai,
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan*

(Received March 4, 2004)

We developed various types of differentiation- and apoptosis-inducing agents against tumor cells and also studied the function and structure of synucleins and taste modifiers. Differentiation- and apoptosis-inducing agents are classified into DNA-damaging agents, Na⁺, K⁺-ATPase inhibitors, agents affecting the redox states of tumor cells, agents affecting signal transduction pathways, isoprenoid compounds, and ATP-noncompetitive tyrosine kinase inhibitors. These include camptothecin, etoposide, cisplatin, transplantin, bufalin, arsenic trioxide, costunolide, C₂-ceramide, daidzein, geranylgeranylacetone, geranylgeraniol, vitamin K₂, sophoranone, and β -hydroxyisovalerylshikonin. The mechanisms of action of these differentiation- and apoptosis-inducing agents are described. The structure and function of synucleins are also reviewed for the development of potential antidementia agents. In addition, the structures of three purified taste modifiers are described.

Key words—apoptosis; cancer; anticancer drug; synuclein; antidementia; taste modifier

1. はじめに

現在、日本では3人に1人が癌で死亡しているが、高齢化がこのまま進めば、2人に1人は癌で死亡する時代が来るとも言われている。また神経細胞死により起きる神経変性疾患も年齢に依存しており、痴呆症の約半数を占めるアルツハイマー病は70歳過ぎに急激に増加し、95歳まで生きるとその半数近くが発症すると言われる。したがって、癌と神経変性疾患の発症には加齢が関与していることは明らかであり、それらの疾患の発症機構の解明と治療薬の開発は重要度が増す一方であると考えられる。私が癌細胞の研究を開始したのは今から約30年前であるが、当時は癌の特効薬など知られておらず、そんなどうせ分からないことはやめておけという雰囲気があった。細胞バンクなどはなかったの

で、ラットの腹水中に癌細胞を継体培養することから始めなければならなかった。まず癌細胞の特徴を調べたところ、細胞内のシグナル伝達系が異常であることが分かった。そこで次に、細胞のシグナル伝達系の中心的な役割を担っているタンパク質リン酸化反応、特にサイクリックAMPに依存しないプロテインキナーゼの研究を始めた。その後、新しい作用機構の抗癌剤を開発する目的で、癌細胞に分化を誘導して正常細胞に変える分化誘導剤や、アポトーシスを誘導して炎症反応を起こさずに癌細胞だけを消滅させるアポトーシス誘導剤をスクリーニングし、それらの作用機構を調べる研究を開始した。神経細胞に特異的に存在するタンパク質の研究は、神経細胞に細胞死を誘導し、神経変性疾患の機構を調べる研究に発展した。また、すっぱいものや水を甘く感じさせる味覚変換タンパク質の精製に成功し、それらの構造を決定した。これらは、糖尿病患者や肥満患者に対し味覚変換剤として応用される可能性がある。本総説では、癌細胞に対する分化・アポトーシス誘導剤に関する研究、神経変性を誘導するタンパク質に関する研究、及び味覚変換タンパク質に関する研究をまとめた。これらの研究は、昭和大学

昭和大学薬学部生物化学教室 (〒142-8555 品川区旗の台 1-5-8)

e-mail: nakaya@niigatayakudai.jp

本総説は、平成15年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

学薬学部生物化学教室の研究者，多くの大学院生，他大学の多数の共同研究者と，十分とは言えないが恵まれた研究環境で協力して行ったものであり，得られた成果はこれらの多くの共同研究者の創意と努力の賜物である。

2. 癌細胞に対する分化・アポトーシス誘導剤

ある種の癌細胞は，分化が異常なために生じたものであり，正常な分化を誘導することにより正常細胞に変えることができる。Ichikawa は，1969 年，マウスの白血病細胞に分化が誘導できることを示した。²⁾ 1980 年代の初めに，白血病患者から採取した白血病細胞をレチノイン酸で分化を誘導できることが報告されており，小規模ではあるが白血病患者の治療に使われていた。³⁾ しかし大多数の臨床例では，否定的な結果しか得られず，レチノイン酸が生体中で有効に働くとは考えられていなかった。このような医学会の常識に反して，癌細胞に分化を誘導して治療する分化誘導療法が可能であることを示したのは中国の Wang らである。1988 年，彼らは急性前骨髄球性白血病患者 24 人にオールトランスレチノイン酸を投与し，そのうち 23 人が完全寛解し

たことを報告した。⁴⁾ 完全寛解とは，末梢血液中に白血病細胞が検出できなくなり，病態も健常時に戻った状態を指す。この結果は，フランス，アメリカ，ついで日本でも追試され本質的に正しいことが確認された。オールトランスレチノイン酸が癌に対して劇的な治療効果を示した最初の抗癌剤と言える。

また，アポトーシスと言う細胞死の 1 つの概念は，1972 年に最初に報告されたもので，⁵⁾ 細胞膜が破壊されずに細胞が縮小し，染色体の凝集や切断，核の断片化が起こり，それらを取り巻くようにアポトーシス小体が形成され，それらがマクロファージや顆粒球により貪食されて消滅する細胞の死に方を言う。1990 年代になって，癌細胞に傷害を与えて殺すことを目的として開発された従来の化学療法剤の多くがアポトーシス誘導能を持つことが報告され，また化学療法剤で治療された癌患者の組織中にアポトーシスを起こした細胞が検出されていた。⁶⁾ したがって，もし癌細胞に特異的にアポトーシスを誘導できる薬物が開発されれば，理想的な抗癌剤となる可能性があると考えられるようになった。現在考えられている一般的なアポトーシス誘導機構を Fig. 1 に

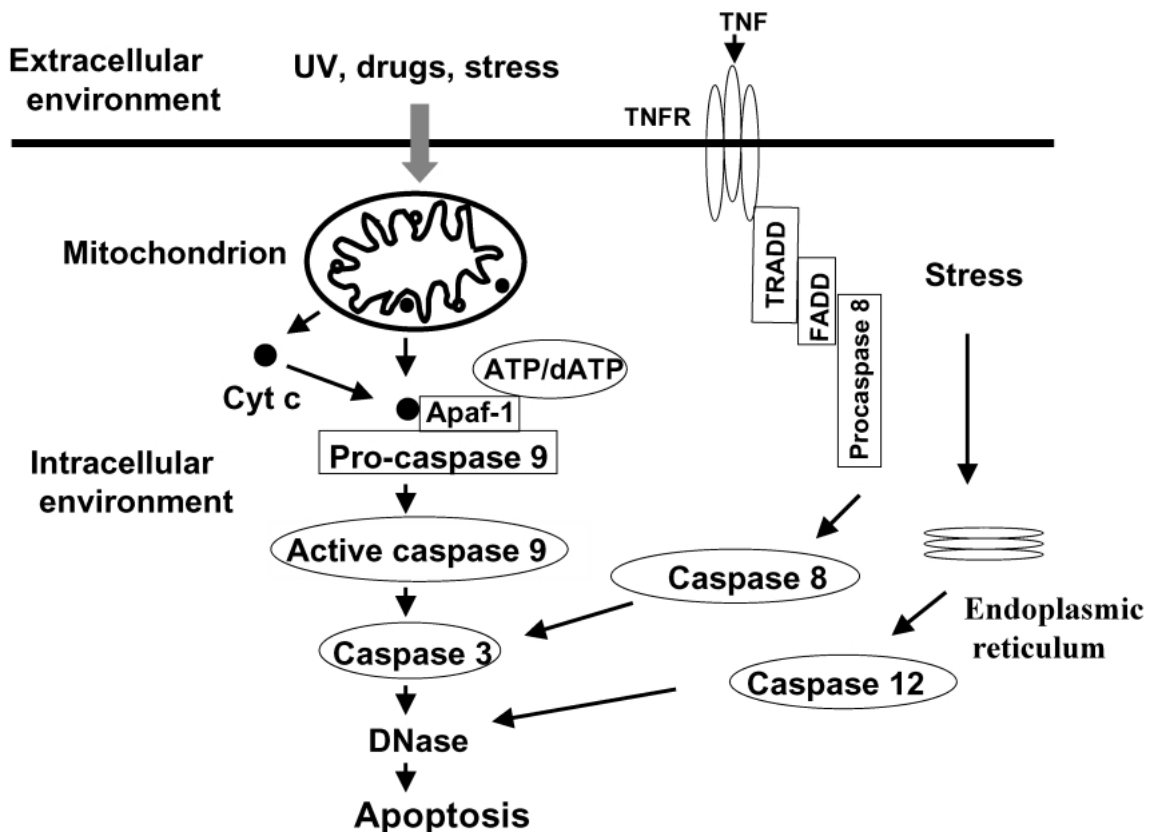


Fig. 1. Integrated Apoptotic Pathways

示す。腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等の death ligand と呼ばれる因子が、細胞膜上のそれに特異的なリセプターに結合すると、リセプターが三量体を作る。次にそのリセプターの細胞質部分に death domain を持つタンパク質が次々に結合し、さらにそこに caspase 8 の前駆体が結合する。Caspase は cysteiny aspartate specific proteases の下線の文字を取って付けた名称で、システインプロテアーゼの一種である。活性化した caspase 8 は、caspase 3 を切断して活性化し、それが DNase を活性化して DNA が断片化される。もう 1 つの経路は、シグナルが MAP (mitogen-activated protein kinase) キナーゼファミリーに伝達され、その後ミトコンドリアの傷害が起こり、シトクロム c が細胞質へ溶出する。シトクロム c は、Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) と caspase 9 の前駆体と複合体を作り、caspase 9 が活性化される。活性化された caspase 9 は、やはり caspase 3 を活性化する。この他に、小胞体膜にストレスが掛かり、caspase 12 を活性化するという経路もある。

2-1. ペプチド性、タンパク質性因子

2-1-1. 腫瘍壊死因子 (TNF) TNF は、腫瘍組織を壊死させる因子として命名され、精製された。^{7,8)} 発見当初は、マウスの腫瘍が実際に TNF により消滅したことから注目を集めた。われわれは、種々のリポ多糖によりマウスの血清中に産生される TNF の活性を測定中に、TNF がマウスの白血病細胞に分化を誘導することを見出した。^{9,10)} 同時期に、TNF がヒトの白血病細胞に分化を誘導することが他の研究者により報告された。^{11,12)} しかし、リコンビナント TNF では、マウスの血清中から部分的に精製した TNF と比べて分化誘導活性が弱かったことから、TNF の分化誘導活性は他の因子との相乗作用によるものと考えられる。¹⁰⁾

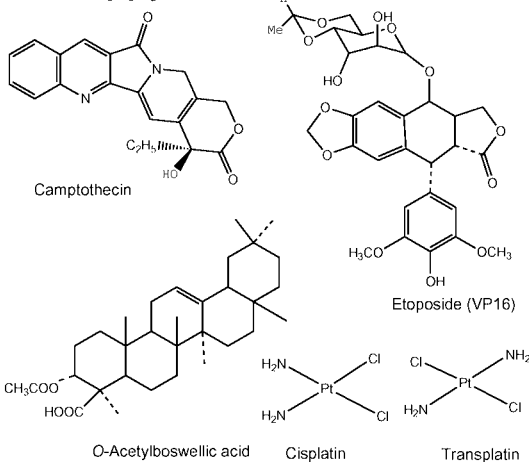
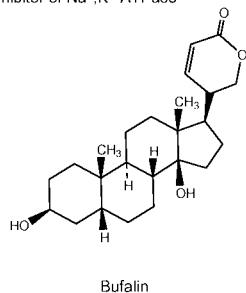
2-1-2. ペプチド性分化誘導因子 マウスの白血病細胞からマクロファージ様細胞に分化した細胞を培養中に、低分子量の分化誘導因子が分泌されていることを見出し、その因子を精製した。^{13,14)} 低分子量分化誘導因子の分子量は、約 1300 で、12 個のアミノ酸から構成されている。N 末端はブロックされている。このペプチド性分化誘導因子は、ヒトの白血病 ML1 や HL-60 細胞の増殖を 10^{-7} M のレベルで阻害し、分化を誘導した。¹⁴⁾

2-2. DNA に傷害を与える薬物

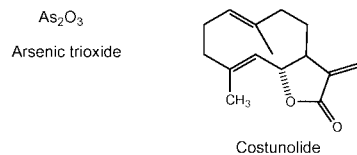
2-2-1. カンプトテシン カンプトテシン (Fig. 2) は、中国原産の喜樹 (*Camptotheca acuminata*) から単離されたアルカロイドで、DNA の一本鎖の切断と再結合を触媒するトポイソメラーゼ I の阻害剤である。カンプトテシンは、トポイソメラーゼ I と DNA 鎖の複合体形成を安定化させ、DNA の一本鎖切断を起こさせる。カンプトテシンは、出血性膀胱炎を起こさせるため、治療薬としての開発が中断されていたが、その誘導體で毒性の低いカンプトテシン 11 (イリノテカン) が合成されて、主として抵抗性大腸癌の治療薬として使用されるようになっている。¹⁵⁾ 1990 年、筆者らは、癌細胞に傷害を与えて細胞増殖を阻害すると考えられていたカンプトテシンにヒト白血病細胞に対する分化誘導作用があることを最初に報告した。¹⁶⁾ 3×10^{-9} M— 2×10^{-8} M のカンプトテシンで種々のヒト白血病細胞の分化が誘導され、分化誘導の引き金は 30 分以内で引かれている。¹⁶⁾ この濃度範囲で、カンプトテシンはトポイソメラーゼ I と DNA 鎖の複合体形成を安定化させ、DNA の一本鎖切断を起こし始める。¹⁶⁾ 同時期に、この濃度より高いカンプトテシンがアポトーシスを誘導することはいくつかのグループにより報告された。¹⁷⁻¹⁹⁾ 正常な分化誘導に対処できなくなったときにアポトーシス誘導に向かうのであろう。あるいは、heat shock protein27 (HSP27) のような分化とアポトーシス誘導のスイッチ役があるのかもしれない。²⁰⁾

2-2-2. エトポシド トポイソメラーゼ II の阻害剤も白血病細胞の分化を誘導する。エトポシド (VP16) は、植物ポドフィルム (*Genus podophyllum*) の根からの抽出物 (podophyllotoxin) の誘導體 (Fig. 2) で、DNA 鎖とトポイソメラーゼ II の複合体形成を安定化させ、DNA の二本鎖切断を起こす。われわれは、エトポシドが DNA の二本鎖切断を起こす濃度より低い濃度 (10^{-9} M— 10^{-8} M) で種々の白血病細胞に分化を誘導することを見出した。²¹⁾ この濃度のエトポシドでも白血病細胞内の DNA 一本鎖の切断は起こり始めており、やはり 30 分以内に分化誘導のシグナルは出されている。²¹⁾ エトポシドやカンプトテシンと急性前骨髄球性白血病 (APL) の患者の抗癌剤であるレチノイン酸とを併用すると分化誘導作用は相乗的に増強される。²²⁾ し

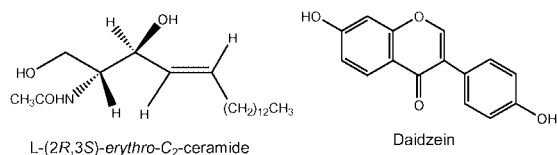
1. DNA-damaging agents

2. Inhibitor of Na⁺, K⁺-ATPase

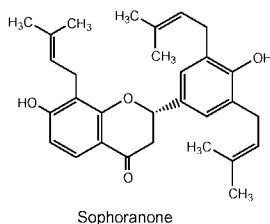
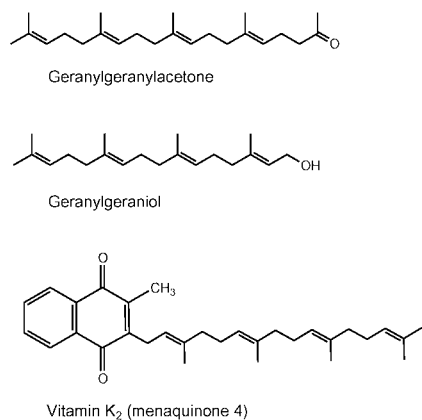
3. Compounds that affect the redox state of cancer cells



4. Second messengers and effectors in signal transduction



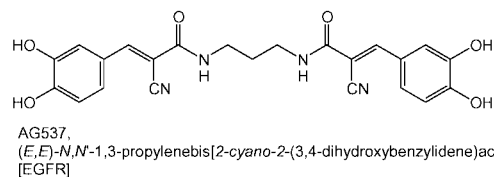
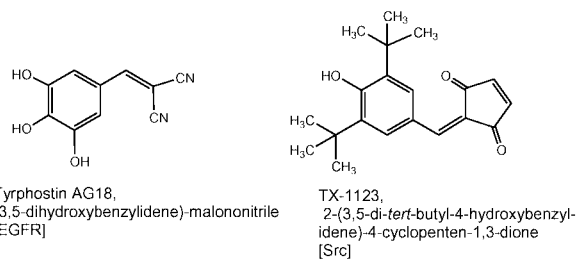
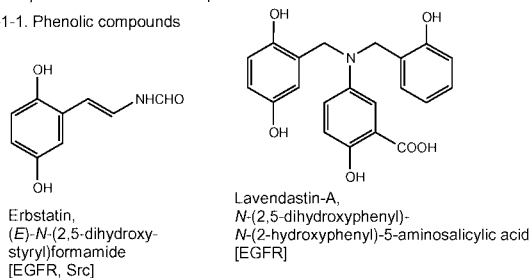
5. Isoprenoids



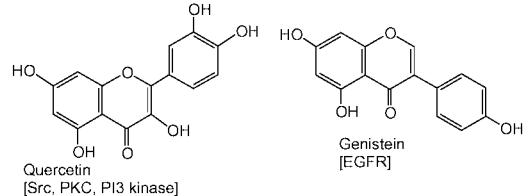
6. Inhibitors of protein tyrosine kinase, with their targets in brackets.

6-1. Competitive inhibitors with respect to ATP

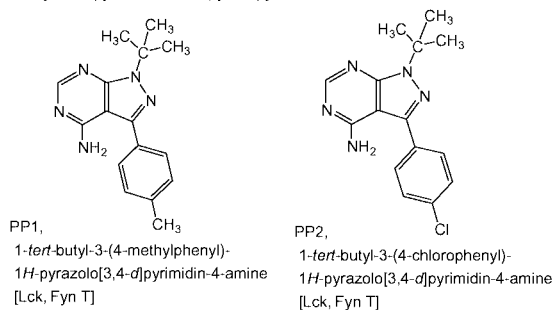
6-1-1. Phenolic compounds

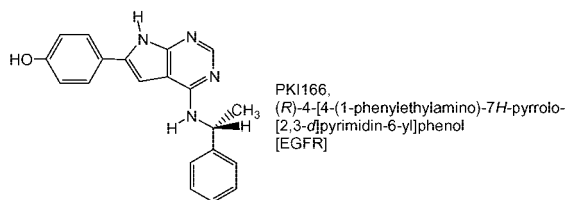


6-1-2. Flavones and isoflavones

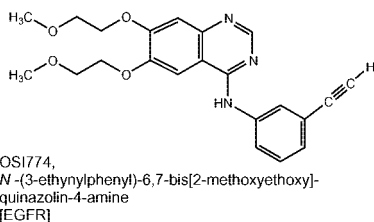
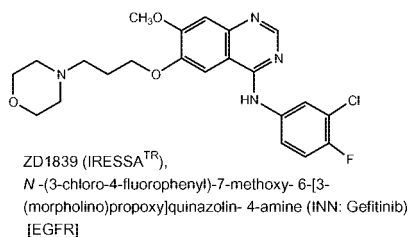


6-1-3. Pyrazolopyrimidines and pyrrolopyrimidines

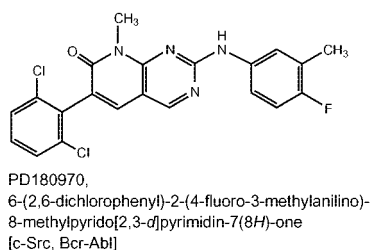
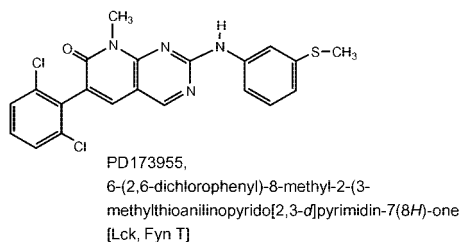
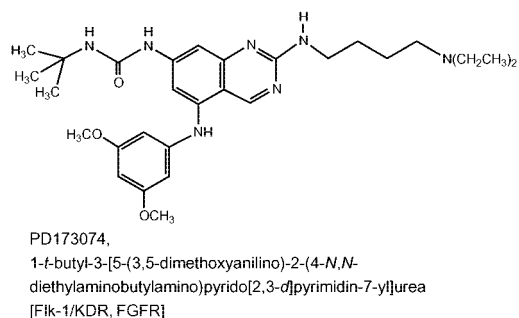
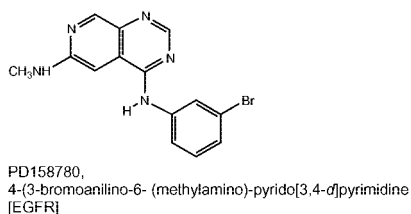




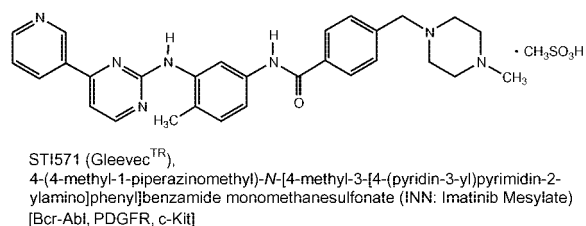
6-1-4. Quinazolines



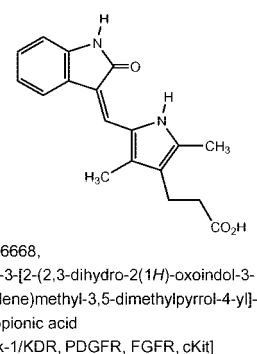
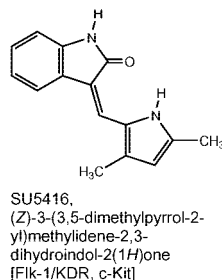
6-1-5. Pyridopyrimidines



6-1-6. Phenylaminopyrimidines

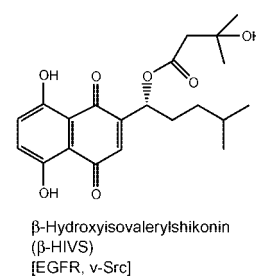
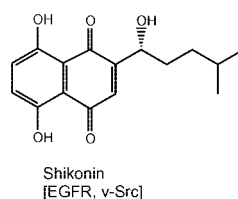


6-1-7. Oxindoles and Indoles



6-2. Non-competitive inhibitors with respect to ATP

6-2-1. Naphthoquinone derivatives



6-2-2. Quinone derivative

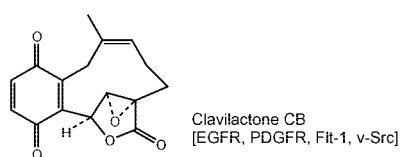


Fig. 2. Chemical Structures of Several Inducers of Differentiation and Apoptosis

たがって、このような用法によりレチノイン酸の投与量を減らし、副作用を軽減できる可能性がある。

中国医学アカデミーの Han, Jing との共同研究で、約 600 種類の漢方薬成分の中から白血病細胞に対する分化誘導能を指標としてスクリーニングされた化合物の 1 つがアセチルボスウェル酸 (acetyl-boswellic acid) である。アセチルボスウェル酸は、トポイソメラーゼ II を阻害し、細胞周期を G1 期で停止させ、種々のヒト白血病細胞に分化を誘導する。²³⁾ これらの他に、最近、南アメリカ産植物 Lapacho (*Tabebuia Avenlanedae*) の樹皮に存在する β -Lapachon がトポイソメラーゼ I 及びトポイソメラーゼ II を阻害し、乳癌 MCF-7:WS8 細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている。²⁴⁾

2-2-3. シスプラチン, トランスプラチン シスプラチン (*cis*-Diaminedichloroplatinum (II), CDDP) は、150 年も前に合成されたプラチナ化合物で、胃癌や膀胱癌に対する抗癌剤として世界的に広く使用されている (Fig. 2)。CDDP は、DNA のプリンに富む領域に結合し、主に 1,2-intrastrand のグアニン-グアニン間やアデニン-グアニン間を cross-link する。その結果、DNA 鎖が部分的にほどけたり、ねじれが生じたりする。このような DNA 傷害が起こると、それがシグナルとなって DNA 依存性プロテインキナーゼが活性化され、癌抑制遺伝子 p53 を誘導する。生成した P53 は Bax を誘導し、Bax はさらにアポトーシスを誘導を阻害する Bcl-2 と複合体を作り、Bcl-2 の作用を阻害してアポトーシスが誘導されると言われている。^{25,26)} 最近、DNA の二本鎖が切断されるような傷害を受けるとヒストン H1.2 が核から溶出して、ミトコンドリアに移行し、Bak と複合体を作ってシトクロム c を遊離させてアポトーシスを誘導することが証明された。²⁷⁾

トランスプラチン (*trans*-Diaminedichloroplatinum (II): *trans*-DDP) は、1,2-intrastrand の cross-link は作れず、1,3-intrastrand の cross-link を作り、アポトーシス誘導能はないと報告されている (Fig. 2)。²⁵⁾ われわれは、予想に反して CDDP や *trans*-DDP が EGFR の自己リン酸化を阻害し、その阻害作用は後述するチロシンキナーゼ阻害活性を持つシコニン誘導体と併用すると相乗的に増強されることを見出した。^{28,29)} その結果、アポトーシスも相乗的

に誘導される。

2-3. Na⁺, K⁺-ATPase 阻害剤ブファリン 生薬センソはヒキガエルの皮膚からの分泌液を乾固したものであるが、その第 3 番目の成分であるブファリン (Fig. 2) がヒトの癌細胞に対し強力な増殖阻害作用や分化誘導作用があることを見出した。³⁰⁾ ブファリンの作用は、ヒトの癌細胞に対して特異的で、マウスやラットの癌細胞には全く無効である。³¹⁾ ブファリンがヒトの癌細胞の増殖を 50% 阻害するのに必要な濃度は、 10^{-9} M— 10^{-7} M と非常に低い。この増殖阻害の原因の 1 つは、癌細胞に分化が誘導されるからであり、このような低濃度で有効分化誘導剤はビタミン D₃ の活性型である 1.25-ジヒドロキシビタミン D₃ (10^{-9} M— 10^{-8} M) に匹敵する。³²⁾ ブファリンには強心作用があることが知られており、これは Na⁺, K⁺-ATPase を阻害することにより、Ca²⁺ の流入を促進することによって考えられている (Fig. 3)。Na⁺, K⁺-ATPase 活性もこのような低濃度のブファリンで阻害され、³³⁾ 細胞内の Na⁺ の濃度変化を抑えるとブファリンの作用も阻害されるので、ブファリンの最初のターゲットは Na⁺, K⁺-ATPase と考えられる。³⁴⁾

癌細胞の分化誘導に必要な濃度より高い 10^{-8} M— 10^{-7} M のブファリンは、アポトーシスを誘導する。³¹⁾ 白血病細胞のブファリンによるアポトーシス誘導の際には、Fig. 4 に示すように種々のシグナルが細胞内に伝達される。シグナル伝達経路のうちの 1 つは、癌細胞の浸潤誘導遺伝子である Tiam-1 (T lymphoma invasion and metastasis) が活性化される経路である。³⁵⁾ Tiam-1 は、低分子量 GTP 結合タンパク質である Rac の GDS (GDP-dissociation stimulator) タンパク質で、GDP が結合した不活性型の Rac から GDP を解離させ、GTP が結合した活性型の Rac に変えることができる (Fig. 5)。ブファリン処理後 1 時間で Tiam-1 が活性化し、Rac を活性化する。活性化された Rac は、MAP (mitogen-activated protein kinase) キナーゼファミリー (Fig. 6) に属する PAK を活性化し、順次、MEKK, SEK1 を活性化し、最後に JNK1 (c-Jun N-terminal kinase 1) が活性化される (Fig. 4)。このようにタンパク質リン酸化及び脱リン酸化反応は、細胞内のシグナル伝達手段として繁用されている (Fig. 7)。³⁶⁾ JNK1 によりリン酸化された c-Jun は核

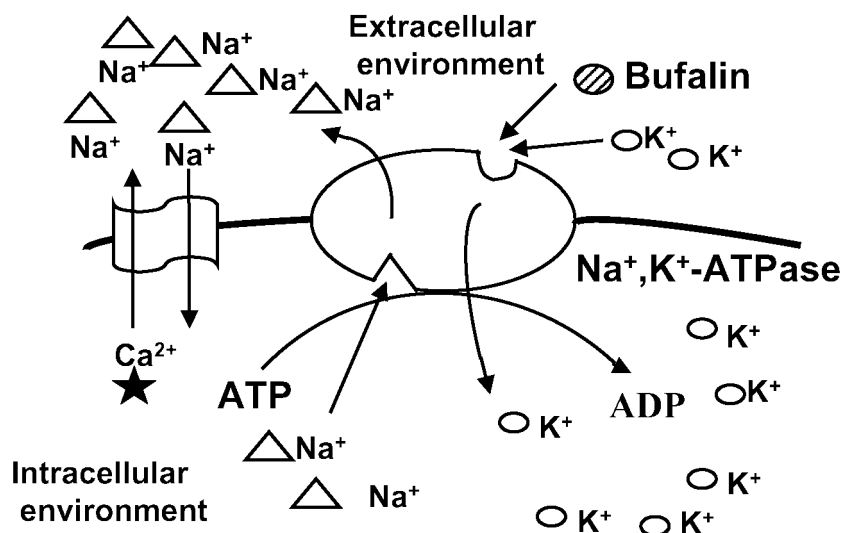


Fig. 3. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by Bufalin

Calcium ions are transported out of the cell in exchange for sodium ions that are outside the cell. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by bufalin might cause accumulation of calcium ions in the cell.

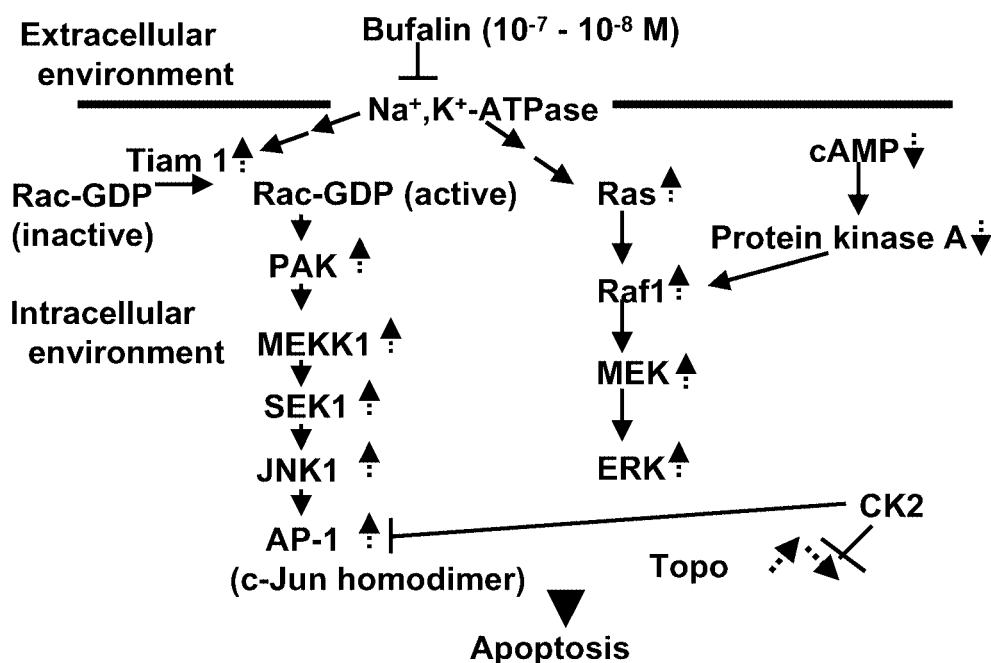


Fig. 4. Cooperative Interactions among Signaling Pathways in Response to Bufalin and the Induction of Apoptosis in Leukemia Cells

▲: Activated, ▼: inactivated. Bufalin induces the translocation of CK2 to the nucleus and the enzyme might inhibit both the activation of AP-1 and the deactivation of topoisomerase II.

内に移行し、ホモダイマーになり転写制御因子 AP-1 を形成する。c-Jun のドミナントネガティブ発現株を作成し、AP-1 活性を抑えるとブファリンによるアポトーシス誘導も阻害されることから、AP-1 活性の上昇がアポトーシス誘導に必要であると考えられる。³⁶⁾ ブファリン処理による AP-1 活性の上昇は一過性であるが、この AP-1 の活性減少に

は AP-1 活性のネガティブレギュレーターであるカゼインキナーゼ 2 が関与していることが示唆されている。^{37,38)} 最近、カゼインキナーゼ 2 は、細胞の分化や genotoxic stress に対する防御に関与していると報告されており、³⁹⁾ ブファリンで白血病 U937 細胞を処理すると 6 時間後にカゼインキナーゼ 2 は細胞質から核へ移行する。³⁷⁾ 核へ移行したカゼインキ

ナーゼ 2 は c-Jun をリン酸化し、AP-1 活性を低下させるのであろう。一方、ブファリン処理によりトポイソメラーゼ II 活性が減少するが、⁴⁰⁾ トポイソメラーゼ II はカゼインキナーゼ 2 と複合体を形成することから、³⁷⁾ トポイソメラーゼ II 活性の減少

による genotoxic stress に対してカゼインキナーゼ 2 が防御的に働いているのかもしれない。

ブファリン処理により活性化されるもう 1 つの経路は、低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras を介する経路である。シグナルは、Ras から MAP キナーゼ

GDS = GDP-dissociation stimulator = Tiam1

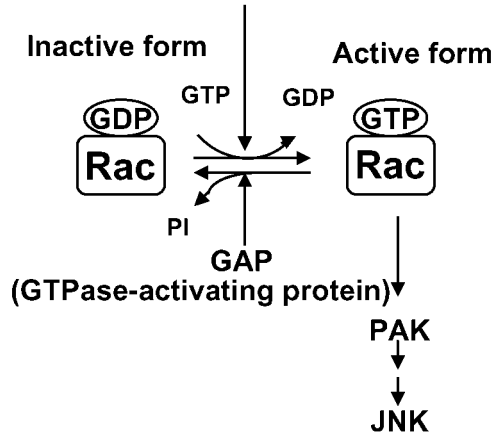


Fig. 5. Activity of Tiam1

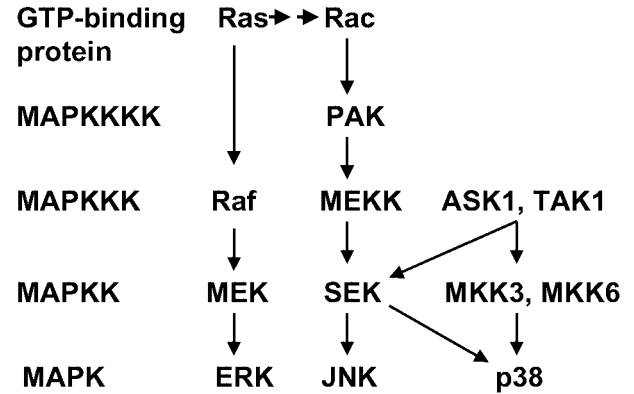
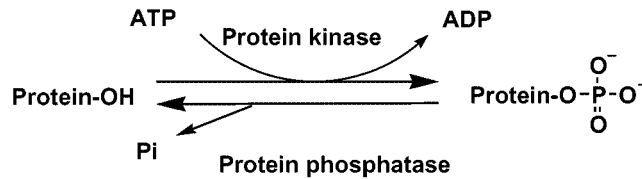


Fig. 6. MAP Kinase Cascades

Each MAP kinase cascade involves reactions catalyzed by a linked series of kinases, namely, MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), MAP kinase kinase (MAPKK), and MAP kinase (MAPK). The signal is transmitted by phosphorylation.

A. Phosphorylation and dephosphorylation of proteins



B. Prenylation of proteins

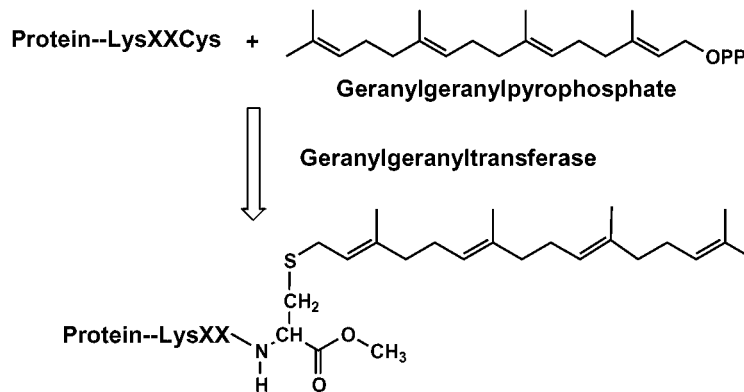


Fig. 7. Post-Translational Modification of Proteins

A: A phosphate residue is transferred to the hydroxyl group of a protein. B: A geranylgeranyl group is attached to the sulfur atom of a cysteine residue in a reaction that is catalyzed by geranylgeranyl-transferase.

ファミリーである Raf-1, MEK へ伝わり, Erk が異常に活性化される (Fig. 4).⁴¹⁾ この異常な Erk の活性化は, プファリン処理により細胞内の cAMP 濃度が減少し, プロテインキナーゼ A による Raf-1 のリン酸化が減少したためであろう.⁴¹⁾ プファリンによる白血病細胞のアポトーシスの誘導には, このように張り巡らされたシグナル伝達経路が複雑に影響し合って引き起こされるのであろうと考えられる. なお, プファリンは MAP キナーゼの中のもう 1 つのメンバーである p38 の活性には全く影響しない.

2-4. 細胞の酸化・還元状態に影響を与える薬物

2-4-1. 亜ヒ酸 1997 年, 急性前骨髄球性白血病患者の中で, レチノイン酸が有効でない患者や再発した患者に亜ヒ酸による治療が有効であることが報告された.⁴²⁾ 実際, 日本人の患者でこの治療を受けて完全寛解した例もある. 急性前骨髄球性白血病の原因である融合遺伝子産物の PML-RAR α タンパク質を亜ヒ酸は減少させると言う報告もある.⁴³⁾ しかしながら, 亜ヒ酸は皮膚や肺の組織に対して発癌作用があり, 副作用も強い. 亜ヒ酸の作用機構が解明されれば, 副作用のない亜ヒ酸様作用を持つ薬物を探索できるのではないかと考えて, 白血病細胞に対するアポトーシス誘導機構を調べた. 白血病 U937 細胞を亜ヒ酸で処理すると, p38 活性が上昇し, ERK1 及び ERK2 の活性は直ちに阻害された.⁴⁴⁾ p38 や ERK の亜ヒ酸によるこのような変動は, 阻害剤や活性化体の導入, あるいはこれらの遺伝子欠損株での結果からアポトーシス誘導への寄与は少ないと考えられる. JNK 活性は, 亜ヒ酸処理後にいったん増加してから低下するが, JNK のこのような活性変動はアポトーシス誘導をむしろ阻害しているようである. 亜ヒ酸による処理で特徴的なのは, 細胞内の pH が低下し, Ca²⁺ に依存してスーパーオキシドが生成することである.⁴⁴⁾ スーパーオキシドの生成は, 還元剤の N-acetyl-L-cysteine (NAC) で完全に阻害されるが, ビタミン E は影響がない. ミトコンドリアの膜電位も Ca²⁺ に依存して低下する. 亜ヒ酸処理による細胞内の pH の低下は, TPA により抑制されるので, 後述するゲラニルゲラニオールの場合と同様にプロテインキナーゼ C が Na⁺, H⁺-antiporter を活性化し, これが細胞内の pH の低下を抑えていると考えられ

る.

2-4-2. コスツノリド (Costunolide) ホウ (*Magnolia sieboldii*) の茎皮から抽出した sesquiterpene であるコスツノリド (Fig. 2) の α -methylene- γ -lactone 部分は, 細胞内の酸化還元状態の平衡を制御しているグルタチオンと結合する. 白血病 U937 細胞をコスツノリドで処理するとアポトーシスが誘導されるが, これはコスツノリドが細胞内のグルタチオンと結合し, 減少させたためであろう.⁴⁵⁾ NAC やグルタチオンの存在下では, コスツノリドによるアポトーシス誘導は完全に阻害される. また, Bcl-2 は細胞内のグルタチオン含量を制御していると言われていたが, Bcl-2 を高発現させた U937 細胞ではコスツノリドによるグルタチオン含量の低下は起こらないし, アポトーシスも誘導されない.⁴⁵⁾

2-5. セカンドメッセンジャーやシグナル伝達に影響を与える薬物

2-5-1. C₂-セラミド 細胞内のシグナル伝達のセカンドメッセンジャーであるセラミドは, スフィンゴミエリンからスフィンゴミエリナーゼにより代謝されて作られ, さらにセラミダーゼにより分解されてスフィンゴシンになる. Fas により誘導されるアポトーシスにスフィンゴシンが関与していることが報告されている.⁴⁶⁾ われわれは, 水に可溶性で細胞膜透過性の合成した C₂-セラミド (L-(2R,3S)-erythro C₂-ceramide) が白血病 HL-60 や U937 細胞にアポトーシスを誘導することを示した.⁴⁷⁾ 白血病細胞を C₂-セラミド (Fig. 2) で処理すると, 細胞内のスフィンゴシン濃度が高まるので, 細胞内に入った C₂-セラミドがスフィンゴシンの代謝経路を阻害し, その結果蓄積したスフィンゴシンがアポトーシスを誘導すると推定される.

最近, 乳癌カルシノーマの皮膚転移予防薬として使われているヘキサデシルホスホコリンがスフィンゴミエリン生合成を阻害し, 蓄積したセラミドがアポトーシスを誘導することが報告された.⁴⁸⁾

2-5-2. 細胞内 cAMP の濃度を変化させる薬物 細胞内の cAMP の濃度変化もアポトーシスを誘導する. 茶の葉に存在するアルカロイドで, ホスホジエステラーゼ阻害活性のあるテオフィリン (Theophylline) は, B 慢性リンパ球性白血病 B-CLL にアポトーシスを誘導する.⁴⁹⁾ Dibutyryl-

cAMP も同様にアポトーシスを誘導するので、cAMP の濃度上昇が引き金になっているのであろう。

2-5-3. ダイゼイン 中国の Jing と Han との共同研究により、数 100 種類の化合物の中から分化誘導能を指標としてスクリーニングしたダイゼイン (Fig. 2) が、*in vitro* 及び *in vivo* で白血病 HL-60 細胞を分化誘導することが見出された。⁵⁰⁾ ダイゼインは、植物クズ (*Pueraria lobata*) の根から抽出されるイソフラボンである。レチノイン酸等の多くの分化誘導剤と同様に、ダイゼインは細胞周期を G₁ 期で停止させる。その後、ダイゼインには、カゼインキナーゼ 2 の阻害活性があることが報告されているので、この酵素が直接のターゲットかもしれない。⁵¹⁾

2-6. イソプレノイド化合物

2-6-1. ゲラニルゲラニオール, ゲラニルゲラニルアセトン イソプレノイドとは、イソプレン (C₅H₈) を構成単位とする化合物の総称である。癌遺伝子産物である Ras を始め多くのイソプレノイド修飾タンパク質がシグナル伝達に関与している。アポトーシス誘導にタンパク質イソプレニル化が関与していることは、イソプレノイド生合成の律速酵素であるヒドロキシシメチルグルタリル (HMG)-CoA リダクターゼの阻害剤であるロバスタチンが白血病 HL-60 細胞やグリオーマ細胞にアポトーシスを誘導することから証明された。⁵²⁾ G タンパク質である Ras はファルネシル化を受けてから発癌作用を示すことより、ファルネシルトランスフェラーゼの阻害剤が新規抗癌剤として検討されている。⁵³⁾ しかし、生体中ではファルネシル化されたタンパク質よりゲラニルゲラニル化されたタンパク質ははるかに多い (Fig. 7)。われわれは、ゲラニルゲラニル基を持つ抗潰瘍薬であるゲラニルゲラニルアセトン (Fig. 2) が白血病細胞に対し分化誘導能を持つことを見出した。⁵⁴⁾ ゲラニルゲラニル基を他のイソプレニル基に変えると分化誘導能は消失する。⁵⁴⁾ 一方、ゲラニルゲラニル基を有するアルコールであるゲラニルゲラニオールは、白血病細胞に対する分化誘導能は低く、アポトーシス誘導能が高い。^{55,56)} ゲラニルゲラニオールによるアポトーシス誘導機構の特徴の 1 つは、反応が非常に速やかに進行することである。白血病 HL-60 細胞を 50 μM のゲラニルゲ

ラニオールで 3 時間処理すると、DNA の約 80% が断片化する。⁵⁵⁾ Figure 8 に示すように、ゲラニルゲラニオールは細胞内に入り、MAP キナーゼファミリーの MEKK1, SEK, JNK1 を順次活性化し、活性化された JNK1 は転写因子 c-Jun をリン酸化し活性化する。⁵⁷⁾ 他のアポトーシス誘導剤による機構と異なり、ゲラニルゲラニオール処理によりリン酸化された caspase 3 は MEKK1 を切断して活性化することが示されている。⁵⁷⁾ また、小胞体に存在するカルシウム結合タンパク質である転写因子カルレチキュリン (calreticulin) と分子量 36 kDa のチロシンリン酸化されたタンパク質が DNA の断片化に先立って顕著に減少する。⁵⁸⁾ このような現象はトポイソメラーゼ阻害剤やブファリンでは認められないので、ゲラニルゲラニオールによるアポトーシス誘導機構は特殊なのであろう。ゲラニルゲラニオール処理によりカルレチキュリンが減少することは、カルシウムイオンが小胞体から細胞質に放出されることを示唆する。カルシウムキレート剤により細胞内のカルシウムイオン濃度を低下させると、ミトコンドリアからのシトクロム c の遊離が抑制されるので、放出されたカルシウムイオンはミトコンドリアからのシトクロム c の放出を促進し、カスパーゼを活性化すると考えられる。⁵⁷⁾ また、ブファリンやエトポシドによるアポトーシス誘導と異なり、プロテインキナーゼ C がゲラニルゲラニオールの誘導するアポトーシスを制御していることも特徴の 1 つである。⁵⁷⁾ これはプロテインキナーゼ C が Na⁺, H⁺-antiporter を活性化し、⁵⁹⁾ ゲラニルゲラニオールにより引き起こされる細胞内の pH の低下を阻害するためであろう。このようにゲラニルゲラニオールによるアポトーシス誘導機構は、他のアポトーシス誘導剤とは著しく異なっており、他の誘導剤との併用によりアポトーシス誘導能を増強させるのに有用であると考えられる。実際に、白血病 U937 細胞にゲラニルゲラニオールと亜ヒ酸と併用すると相乗的なアポトーシス誘導効果が認められた。⁴⁴⁾

2-6-2. ビタミン K₂ ビタミン K₂ (凝集を表すドイツ語の頭文字 K から命名) に、血液凝固以外の作用があることが分かったのは 1980 年代になってからである。われわれは、1994 年にゲラニルゲラニル基を有するビタミン K₂ (メナキノン 4) (Fig. 2) が、10⁻⁷ M—10⁻⁶ M の濃度で種々の白血

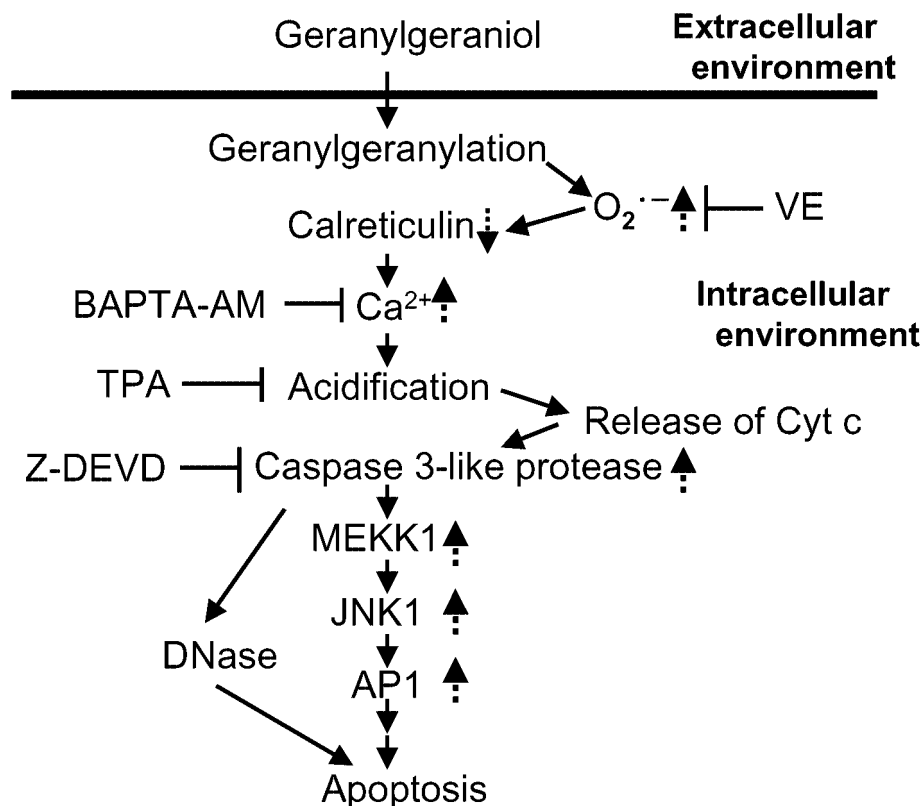


Fig. 8. Mechanism of Induction of Apoptosis by Geranylgeraniol

A decrease in level of calreticulin might increase concentration of Ca^{2+} ions. TPA activates protein kinase C, which activates the Na^+ , H^+ -antiporter, with resultant inhibition of intracellular acidification.

病細胞を分化誘導活性することを報告した。⁶⁰⁾ 側鎖にフィチル基を持つビタミン K_1 は分化誘導作用は全く認められない。骨髄異形成症候群の患者の白血病細胞に対して、低濃度のビタミン K_2 はアポトーシスを誘導する。⁶¹⁾ 実際に、ビタミン K_2 は骨髄異形成症候群の患者の治療にも使用され始めている。^{62,63)}

広範な固形癌由来の細胞に対するビタミン K_2 の影響を調べた結果、膵臓癌及び卵巣癌細胞の中にビタミン K_2 よりアポトーシスが誘導されるものがあることが見出された。⁶⁴⁾ 卵巣癌 TYK-nu 細胞のビタミン K_2 によるアポトーシス誘導は4日間かかる。このようにビタミン K_2 によるアポトーシス誘導は比較的ゆっくり進行するので、作用機構を調べるのに適している。ビタミン K_2 によるアポトーシス誘導はタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドで抑制されることから、新たなタンパク合成が必要で、そのタンパク質は処理後1日以内に合成されることが示唆されている。ビタミン K_2 で処理して2日間以内で起こる癌細胞内の反応は可逆的で、ビタ

ミン K_2 を除去するとアポトーシスは誘導されないが、3日目以降に起こる変化は不可逆的である。このようにアポトーシスの誘導機構を可逆的な過程と不可逆的なものに分けられることを示すことが可能になったのは、ビタミン K_2 によるアポトーシス誘導が徐々に進行するおかげである。ビタミン K_2 で処理後、3日目にはミトコンドリアからシトクロム c が遊離しカスパーゼ3が活性化されるので、ミトコンドリアが一度傷害を受けると修復が不可能になり不可逆的過程に移行すると考えられる。⁶⁴⁾ ビタミン K_2 によるアポトーシス誘導機構も独特であり、骨粗しょう症の治療薬としても使用されていることから分かるように毒性も低く、骨髄異形成症候群以外の癌治療にも臨床応用できないか検討する必要がある。

2-6-3. ソフォラノン 山豆根は、*Sophora subprostrata* Chun et T. Chen の根から調製され、抗癌作用、解毒作用、鎮痛作用があると民間で伝承されている生薬である。そこで山豆根のメタノール抽出物を薄層クロマトグラフィーで分離後 (Fig.

9), 各スポットの白血病細胞に対するアポトーシス誘導能を調べたところ, そのうちの1成分に強力なアポトーシス誘導活性が検出された (Fig. 10). 活性本体を精製後, NMRによる構造解析を行ったところ, イソプレニル化フラボノイド化合物であるソフォラノン (Fig. 2) であった.⁶⁵⁾ 白血病細胞に対するアポトーシス誘導能は, 他のフラボノイド化合物であるダイゼイン, ゲニスタイン, ケルセチンに比べて比較できないほど強いので (Fig. 11), 側鎖がアポトーシス誘導活性に重要なことが分かる. 固形癌細胞の中では, 胃癌の MKN7 細胞に対して低濃度 (IC_{50} 値 = $1.2 \mu M$) で増殖を阻害する. ソフォラノンはゲニスタイン等の他のフラボノイド化合物と異なり, プロテインキナーゼ A, プロテインキナーゼ C, EGFR 等の活性を阻害しない. ソフォラノンのアポトーシス誘導機構を白血病 U937 細胞を使用して調べると, MAP キナーゼである JNK1 活性にはほとんど影響を与えず, ERK1, ERK2 と p38 のキナーゼ活性は減少するが, 阻害剤を用いた実験からこれら MAP キナーゼはアポトーシス誘導には関係しないことが分かった. ソフォラノンは, 形質膜で Ca^{2+} に依存して活性酸素種を発生させ, それがミトコンドリアに傷害を与えてミトコンドリアの permeability transitional pore (PTP) を空け, シト

クロム c を遊離させると考えられる (Fig. 12). また, 細胞内に入ったソフォラノンはミトコンドリアに直接にも傷害を与えることもできる.⁶⁵⁾ したがって, これら両方の作用によりアポトーシスを誘導するのであろう. フラボノイド化合物であるダイゼイン, ゲニスタイン, ケルセチンは, 癌予防剤や抗癌研究用試薬として繁用されている. これらのフラボノイド化合物よりはるかにアポトーシス誘導能の強いソフォラノンの重要性は今後高まるであろう.

2-7. チロシンキナーゼ阻害剤

2-7-1. ATP 拮抗的チロシンキナーゼ阻害剤

Src 遺伝子産物を始めチロシンキナーゼは, 細胞の増殖や癌化に重要な役割を果たしている. したがって, 多くの抗癌剤がチロシンキナーゼの阻害を目的として開発された. チロシンキナーゼ阻害剤は次のように分類することができる.⁶⁶⁾ 第1のグループは, チロシン残基の側鎖に似たフェノール性水酸基を持つアーブスタチン⁶⁷⁾や Lavendstin-A⁶⁸⁾ である. これらは, 特異性は低いが EGFR を阻害する. チロシンに似せて合成された最初のチロシンキナーゼ阻害剤が Tyrphostin 18 等の Tyrphostin と名付けられたグループである.⁶⁹⁾ TX-1123 は, Tyrphostin 誘導体よりもミトコンドリアに対する毒性を低くする目的で合成された.⁷⁰⁾ AG537 は, Tyr-

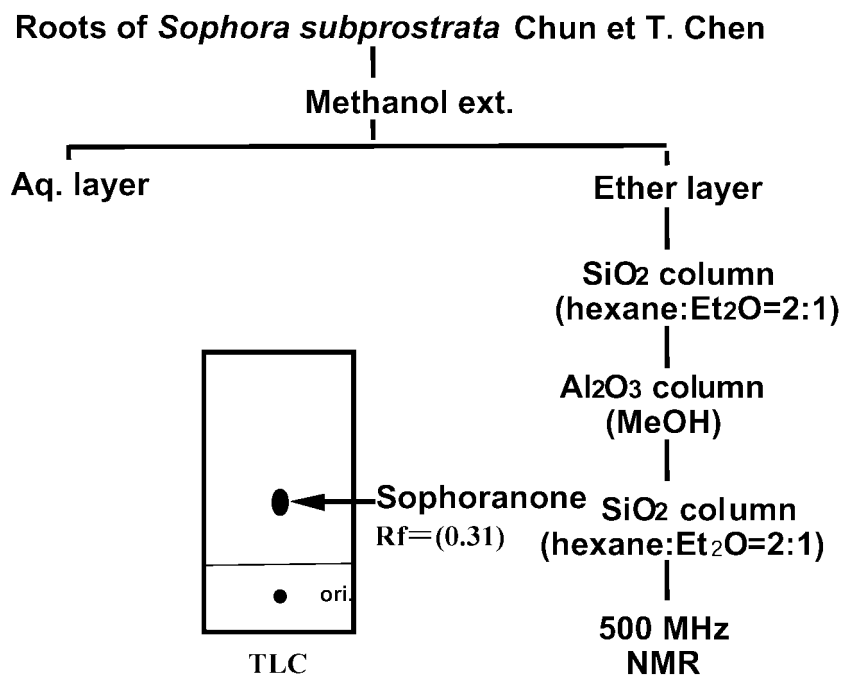


Fig. 9. The Method for Isolation of Sophoranone from the Roots of *Sophora subprostrata* Chun et T. Chun

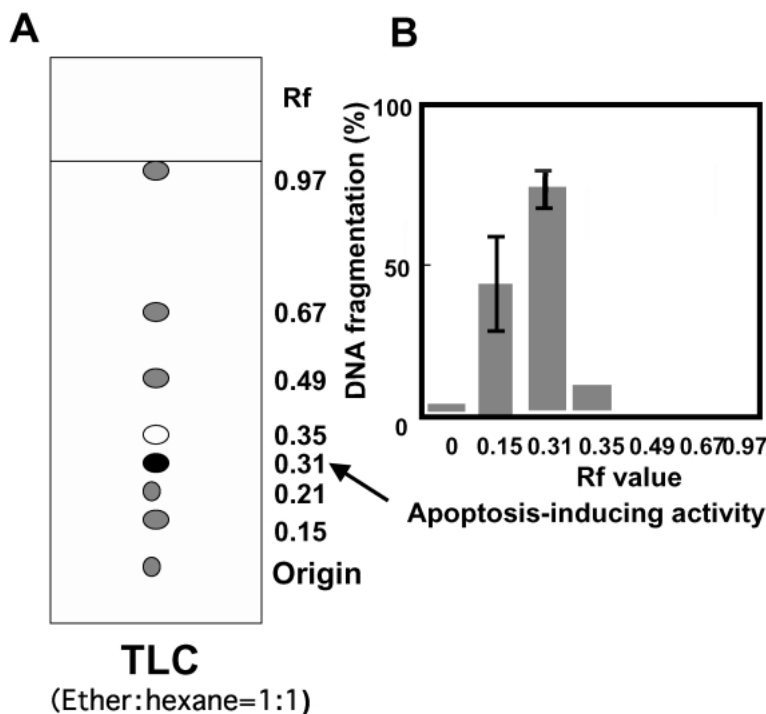


Fig. 10. Fractionation by TLC and Analysis of Apoptosis-Inducing Activity
The ability to induce DNA fragmentation was determined by a fluorometric method after reaction of DNA with DAPI.

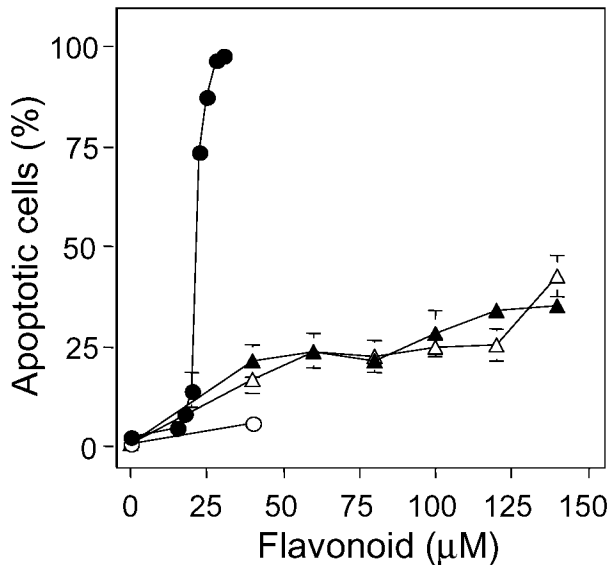


Fig. 11. Apoptosis-Inducing Activities of Sophoranone and Other Flavonoids
Apoptosis-inducing activities are expressed in terms of percentages of apoptotic cells. ●: Sophoranone, ○: daidzein, ▲: genistein, △: quercetin.

phostin の二量体に似せた誘導体で、活性型である EGFR の二量体に結合するようにデザインされている。⁷¹⁾ 第 2 のグループは、ケルセチン⁷²⁾ のようなフラボン類やゲニスタイン⁷³⁾ のようなイソフラボン

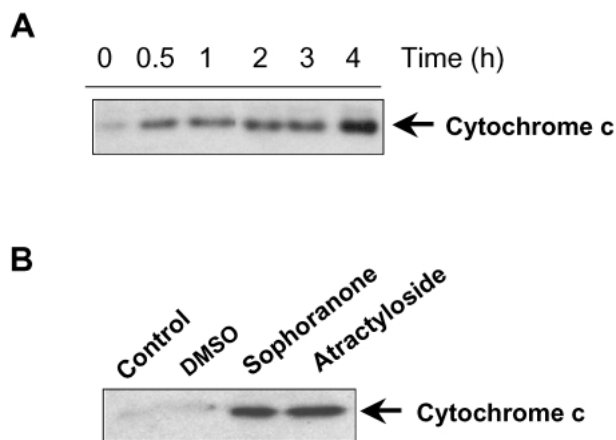


Fig. 12. Release of Cytochrome c in Response to Sophoranone *In vivo* and *In vitro*
A: Leukemia U937 cells were treated with 30 μM sophoranone and release of cytochrome c into the cytosol was detected by Western blotting. B: Isolated mitochondria were treated with sophoranone and analyzed as in A. Atractyloside was used as a positive control.

類である。第 3 のグループはピラゾロピリミジン類やピロロピリミジン類である。これには PP1,⁷⁴⁾ PP2,⁷⁵⁾ PKI166⁷⁶⁾ が含まれる。第 4 のグループに、多くの種類の癌細胞で過剰発現している上皮成長因子リセプター (epidermal growth factor recep-

tor: EGFR) を分子標的として大規模なスクリーニングとチロシンキナーゼの触媒部位に対する分子設計により合成されたキナゾリン類がある。これには ZD1839⁷⁷⁾ や OSI774⁷⁸⁾ がある。ZD1839 (商品名: イレッサ, 一般名: ゲフィチニブ) は, EGFR が過剰発現している非小細胞肺癌に対する経口投与剤として臨床試験が行われ, ⁷⁹⁾ わが国でも肺癌治療薬として外国に先駆けて承認された。しかしその後, 副作用として間質性肺炎や肺障害が発症することが報告され, 安全性の高い投与方法が検討されている。キナゾリン類の構造とチロシンキナーゼ活性の阻害との関係をさらに詳しく調べた結果作られたのが, 第 5 番目のグループのピリドピリミジン類である。これには, EGFR を阻害する PD158780, ⁸⁰⁾ Flk-1/KDR や FGFR を阻害する PD173074, ⁸¹⁾ 癌遺伝子産物である Lck や Fyn のチロシンリン酸化活性を阻害する PD173955, ⁸²⁾ c-Src や Bcr-Abl を阻害する PD180970 がある。^{83,84)} さらにピリドピリミジン類の構造・活性相関の研究を進展させて合成されたのがフェニルアミノピリミジン類で, 初の分子標的抗癌剤と言われる STI571 (商品名: グリーベック, 一般名: メシル酸イマチニブ) が含まれる。^{85,86)} STI571 は, 慢性骨髄性白血病の原因である融合遺伝子 Bcr-Abl の産物 p210 の ATP 結合部位に ATP と競合的に結合し, チロシンキナーゼ活性を選択的に阻害するように分子設計され, 合成された薬剤である。その後, STI571 は c-kit や血小板由来成長因子リセプター (platelet-derived growth factor receptor: PDGFR) のチロシンキナーゼ活性をも阻害することが分かり, ^{87,88)} c-kit が発現している消化管間質性腫瘍 (GIST) や小細胞肺癌, PDGFR が関与しているグリオーマや前立腺癌等の治療にも使用され始めている。^{89,90)}

上述したチロシンキナーゼ阻害剤の大部分は, EGFR や Src ファミリーのチロシンキナーゼ活性を阻害するが, 第 7 番目のグループの SU5416 や SU6668 等のオキシンドール類は血管内皮増殖因子リセプター (vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR) のチロシンキナーゼ活性に対して選択的に阻害する。^{91,92)} その結果, オキシンドール類は, 癌細胞に栄養を補給するために必要な血管の新生を阻害し, 抗癌作用を示す。^{91,92)} 最後に, 上述したグループに属さないものに, v-Src の不可逆

的な阻害剤であるハービマシシン A⁹³⁾ や Clavilactone 類⁹⁴⁾ がある。

2-7-2. ATP 非拮抗的チロシンキナーゼ阻害剤
中国産の薬草ムラサキ (*Lithospermium erythrorhizon*) には抗癌作用を始め種々の薬理作用があるという民間での伝承がある。日本でもムラサキの根は紫根 (*Lithospermi radix*) と呼ばれ, 腫瘍や火傷の治療のための軟膏として外用され, また漢方では消炎や解熱, 解毒などに内用されてきた。紫根の薬効本体とされるシコニン (Fig. 2) は, ナフトキノ誘導体で, ネズミの腫瘍細胞に対して抗腫瘍作用を示すことが報告されている。⁹⁵⁾ われわれは, シコニン中の 1 成分の β -hydroxyisovalerylshikonin (β -HIVS) が, ヒトの種々の癌細胞に対して IC₅₀ 値が 10⁻⁶ M—10⁻⁸ M の低濃度で増殖を阻害し, アポトーシスを誘導することを見出した。⁹⁶⁾ このような強力な細胞増殖阻害・アポトーシス誘導能は活性型ビタミン D₃ やエトポシドやブファリンに匹敵する。しかも白血病 HL-60 細胞を β -HIVS で処理したときに見られる形態変化は, これまでのアポトーシス誘導剤では観察したことがない独特のものであった。⁹⁶⁾ 白血病 HL-60 細胞に対する β -HIVS の増殖阻害能は, シコニンより強い。固形癌細胞に対しては, β -HIVS が 2 種類の肺癌細胞に対する殺細胞作用が強いのに対して, シコニンは広範な種類の癌細胞に対して殺細胞作用を示し, 特異性が低い。⁹⁷⁾ 種々のプロテインキナーゼに与える影響を調べた結果, β -HIVS は EGFR や v-Src 等のチロシンキナーゼに対して特異的な阻害活性を持つことが分かった。⁹⁷⁾ EGFR 及び v-Src のチロシンキナーゼ活性を 50% 阻害する β -HIVS の濃度 (IC₅₀) は, それぞれ, 0.7 μ M 及び 1.0 μ M である。プロテインキナーゼ A やプロテインキナーゼ C などのセリン・トレオニンキナーゼに対して β -HIVS は阻害活性を示さず, プロテインキナーゼ A に対しては 100 μ M まで β -HIVS の濃度を上げて影響が見られなかった。このように β -HIVS は EGFR 及び v-Src のチロシンキナーゼ活性に対して特異的に阻害活性を示したが, シコニンはこれらのチロシンキナーゼ活性を阻害する活性は低く, IC₅₀ 値を算出できなかった。

β -HIVS のチロシンキナーゼに対する阻害機構が, これまでの大部分のチロシンキナーゼ阻害剤と最も異なる点は, ATP と非拮抗的に阻害作用を示

すことである。⁹⁷⁾ Src の合成ペプチド基質である Raytide とは拮抗してチロシンキナーゼ活性を阻害するので、 β -HIVS は基質結合部位に拮抗的に結合するのであろう (Fig. 13)。Table 1 に示すように、これまでに報告されたチロシンキナーゼの阻害剤は、ATP と化学構造式が類似しているために拮抗してチロシンキナーゼを阻害する。特に最近では、チロシンキナーゼの ATP 結合部位にはまり込むようにデザインされて合成されているチロシンキナーゼ阻害剤が大部分である。 β -HIVS が ATP と拮抗せずにチロシンキナーゼ活性を阻害するのは、両者の化学構造の間にほとんど類似点がないためであろう。 β -HIVS のこの特徴は、ATP 濃度の非常に高い生体中の環境で作用させるときに非常に有利である。また、STI571 等の阻害機構が異なる他のチロシンキナーゼ阻害剤と併用すると、さらに有効にチロシンキナーゼ活性を阻害することが期待できる。実際に、Bcr-Abl が存在する白血病 K562 細胞を STI571 と β -HIVS を併用して処理すると、チロシンキナーゼ活性を相乗的に阻害することができる。⁹⁸⁾

β -HIVS の癌細胞に対する作用機構を cDNA ar-

ray 法で解析したところ、polo-like kinase 1 (PLK1) の発現量が減少することが分かった。⁹⁸⁾ Polo 遺伝子は、*Drosophila* の分裂の異常を起こす遺伝子として発見され、polo-like kinase はセリン・トレオニンキナーゼで、細胞分裂の様々な過程に関与している。⁹⁹⁾ 最近では、癌細胞に選択的なアポトーシスの制御に関与していると考えられ始められている。¹⁰⁰⁾ 白血病 U937 及び HL-60 細胞を U937 及び HL-60 細胞を β -HIVS で処理して、PLK1 の発現量が減少するに伴ってタンパク質リン酸化活性も減少した。 β -HIVS によりアポトーシスの誘導されない

Table 1. ATP-Competitive and ATP-Non-Competitive Inhibitors of Protein Tyrosine Kinases

ATP-competitive	ATP-non-competitive
Erbstatin, tyrphostin, AG814, quercetin, genistein, laven-dastin-A, 4-(3-bromoanilino)-quinazoline, OS1774, STI571, PD158780, pD0166326, PD180970, 4-(phenylamino)-7H-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidine, SU6668	Substrate-competitive: β -HIVS, AG537 Substrate-non-competitive: Clavilactone CB

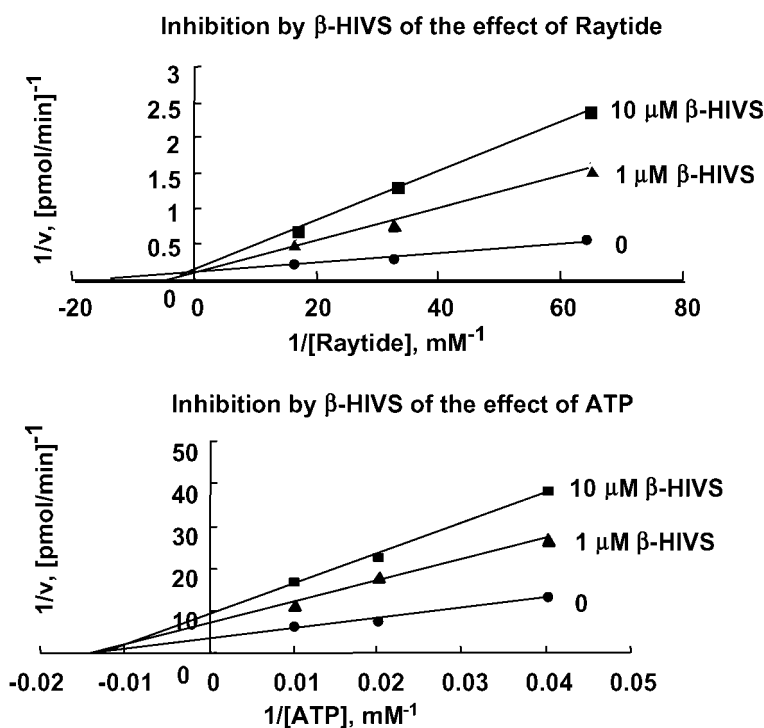


Fig. 13. ATP-Non-Competitive Inhibition by β -HIVS of the Activity of v-Src

The suspension of protein A-Sepharose with bound v-Src was used as the source of v-Src tyrosine kinase and was incubated with substrate Raytide with or without inhibitor, and [γ -³²P]ATP at 30°C for 10 min in assay buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.7, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, and 1 mM NaF. The reaction was terminated by the addition of phosphoric acid.

K562 細胞では、PLK1 の発現量もタンパク質リン酸化活性も変化が認められなかった。K562 細胞では、 β -HIVS に感受性の U937 細胞や HL-60 細胞に比べて PLK1 の発現量が多かったため、PLK1 の antisense オリゴデオキシヌクレオチドを発現させたところ、 β -HIVS 処理によりアポトーシスが誘導されるようになった。 β -HIVS による PLK1 への影響がチロシンキナーゼの阻害によるものかを確認するために、チロシンキナーゼの阻害剤であるゲニスタイン (genistein) で K562 細胞を処理したところ、PLK1 活性の減少が観察された。さらに Bcr-Abl の産物 p210^{bcr-abl} の選択的阻害剤である STI571 と β -HIVS を併用して K562 細胞を処理すると PLK1 活性は顕著に低下し、アポトーシスが相乗的に誘導された。この時、K562 細胞内のタンパク質のチロシンリン酸化もされたタンパク質も STI571 と β -HIVS の併用処理により相乗的に阻害された。したがって、PLK1 の上流に存在するチロシンリン酸化酵素の阻害を介して PLK1 活性の減少が誘導されたことが示唆された。⁹⁸⁾

2-8. 分化・アポトーシス誘導剤開発のまとめと今後の課題 癌細胞に対する低分子量の分化・アポトーシス誘導剤は、本総説に記載した以外にはタンパク合成阻害剤のシクロヘキシミド、チュブリン重合促進剤のタキソール、セリン・トレオニンキナーゼ阻害剤のスタウロスポリン、活性酸素種である過酸化水素等がある。しかしながら、抗癌剤として使用されているタキソール以外は毒性が強く、臨床的には使用できない。本総説に記載した分化・アポ

トーシス誘導剤は、毒性が低いことを第 1 の条件として、主にアジア原産の薬草からスクリーニングされたものであるため、それらの作用機構が明らかになれば、さらに抗癌剤として有用な化合物をスクリーニングしたり、デザインし合成できる可能性がある。Table 2 に本総説で記載した分化・アポトーシス誘導剤の作用機構の一部をまとめて示した。MAP キナーゼについては、JNK と p38 の活性化がアポトーシス誘導と関連していると言われているが、本総説で述べた分化・アポトーシス誘導剤の MAP キナーゼに対する影響は複雑である。これは MAP キナーゼのシグナル伝達経路が次にどのようなシグナル伝達経路と接続しているかと言うことや、MAP キナーゼ系以外のシグナル伝達経路と複雑に連絡し合っていてアポトーシス誘導に寄与しているからであろう。したがって、MAP キナーゼの変動だけでは、アポトーシスの誘導能を予測することは不可能に近い。新規のアポトーシス誘導剤は、MAP キナーゼにシグナルが伝達される前の段階に位置する分子を標的にする必要があるであろう。

還元剤であるビタミン E と NAC の影響には規則性がある。すなわち、ビタミン K₂ やソフォラノンのような脂溶性の分化・アポトーシス誘導剤は、ビタミン E により阻害されるが、NAC によっては影響されない。逆に、亜ヒ酸や β -HIVS のような親水性のものは、NAC により阻害されるが、ビタミン E は影響を与えない。ブファリンだけがビタミン E と NAC のどちらによっても阻害されない。カンプトテシン等の DNA に障害を与えるアポトーシス誘

Table 2. Effects of Inducers of Differentiation and Apoptosis on MAP Kinases and the Production of ROS

Class	Inducer	Effects on MAP kinases			Production of ROS	Effects of reducing agents	
		JNK	p38	ERK	O ₂ ⁻	VE	NAC
DNA-damaging agents	Camptothecin	↑	↑	↑	→	-	-
	Etoposide	↑	↑	→	→	±	±
	Cisplatin	↑	↑	↑	↑	-	±
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase inhibitors	Bufalin	↑	↑	→	↑	-	-
Isoprenoids	GGO	↑	→	→	↑	+	-
	Vitamin K ₂	→	↑	→	↑	+	-
	Sophoranone	→	↓	↓	↑	+	-
Agents that affect redox state	As ₂ O ₃	↑	↑	↓	↑	-	+
Tyrosine kinase inhibitors	β -HIVS	↑	↑	↑	↑	-	+

GGO is the abbreviation of geranylgeraniol. MAP kinases: activated (↑), inactivated (↓), no change (→). Production of O₂⁻: produced (↑), not produced (→). Inhibition of apoptosis by VE or by NAC: inhibition (+), no inhibition (-), weak inhibition (±).

導剤の場合は、ビタミンEやNACによる阻害が見られても顕著ではない。ビタミンEにより阻害される分化・アポトーシス誘導剤は、脂溶性の生体膜の近傍で作用し活性酸素種を発生させ、NACで阻害される誘導剤は親水性の細胞質で作用するのであろう。このようにビタミンEとNACによる阻害様式により、分化・アポトーシス誘導剤を分類し、それらによる活性酸素種の発生部位を予測することが可能かどうかさらに検討が必要である。

STI571は慢性骨髄性白血病の特効薬とはなったが、この薬剤に抵抗性を示す患者が出現するという深刻な問題が出てきている。¹⁰¹⁾これはBcr-Abl遺伝子の変異を起こしたり、過剰発現が誘導されるためであると解釈される。STI571に対する耐性を克服するためには、STI571とは構造が異なり、作用機構が異なるチロシンキナーゼ阻害剤が必要である。例えば、Bcr-Ablを発現しているがSTI571に耐性な慢性骨髄性白血病細胞に対してもピリドピリミジン系の阻害剤であるPD180970はアポトーシスを誘導できる。¹⁰²⁾これは、STI571がcAblのキナーゼ領域がリン酸化されていない不活性型に結合するのに対して、PD180970はこのキナーゼの活性型に結合するためであると説明されている。¹⁰³⁾上述したように、STI571と β -HIVSを併用するとチロシンキナーゼ阻害活性が相乗的に増大した。^{98,104)}また、チロシンキナーゼ阻害剤ではないが、DNAに傷害を与える抗癌剤であるシスプラチンを β -HIVSと併用して肺癌DMS114細胞を処理すると、チロシンキナーゼ経路を介した細胞増殖阻害とアポトーシス誘導が相乗的に誘導されることが見出されている(Fig. 14)。¹⁰⁴⁾現在開発されているチロシンキナーゼ阻害剤は大部分がATPと拮抗してチロシンキナーゼ活性を阻害するものなので、ATPに対して非拮抗型の β -HIVSのような新しい阻害剤の開発が期待される。

さらに今後は、チロシンキナーゼ阻害剤がどのようなシグナル伝達経路で癌細胞のアポトーシスを誘導するかを明らかにすることが必要である。最近、急性骨髄性白血病の患者の30%にFlt3リセプターのチロシンキナーゼが異常に活性化していることが観察されたが、そのような患者にFlt3リセプターのチロシンキナーゼ阻害剤であるPKC412¹⁰⁵⁾やCT53518¹⁰⁶⁾による治療効果が調べられている。こ

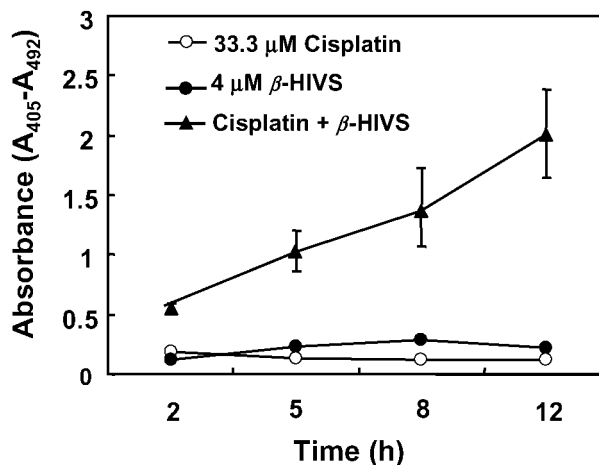


Fig. 14. Synergic Effects of β -HIVS and Cisplatin on the Induction of Apoptosis in DMS114 Cells

The induction of apoptosis was monitored by an ELISA for the detection of cell death.

のように癌細胞のアポトーシス誘導機構の詳細が明らかになれば、その経路のある特定の箇所を特異的に阻害する薬物をスクリーニングしたり、デザインし合成することが可能になるであろう。特に、アポトーシス誘導経路に関わるタンパク質分子群を同定するのに有力な技術は、LC/MS（高速液体クロマトグラフィー質量分析法）である。最新のLC/MSでは、フェムトモル ($f=10^{-15}$) 単位のタンパク質の同定が可能である。具体的には、電気泳動したゲルを最も感度のよい方法で染色したときに検出できるスポットがあればよい。アポトーシス誘導経路上のタンパク質の中から分子標的を選定すればよい。そして最終的に問題となるのは副作用であるから、理想的なアポトーシス誘導剤は、目的とする組織やタンパク質や遺伝子に特異的に作用するものでなければならない。これらの問題をクリアしたものから臨床的に有用な分子標的抗癌剤が次々に生み出されることを期待したい。

3. 神経細胞に細胞死を誘導するタンパク質に関する研究

3-1. シヌクレイノパチー (synucleinopathy)
 神経細胞が異常な細胞死を起こすために発症するのが神経変性疾患で、そのうち最も多いのが老人性痴呆の約50%にも達するアルツハイマー病である。アルツハイマー病の患者は、65—69歳の老人の約1%であるが、70歳過ぎに急増し、95歳では40—50%にも達する。2番目に多い神経変性疾患がパーキ

ンソン病で、65—69歳の老人の0.5—1%、80歳以上では1—3%に増加する。神経細胞にアポトーシスを誘導し、神経変性疾患発症の原因となると考えられているタンパク質の1つがシヌクレインである。パーキンソン病やLewy小体型痴呆症等の病理学的特長である脳中のLewy小体が α -シヌクレインが神経細胞内に蓄積して形成されたものであることが判明すると、脊髄小脳変性症である多系統萎縮症のグリア封入体やHallevordin-Spatz病の変性神経突起等にも α -シヌクレインの蓄積が観察され、これら α -シヌクレインが脳内に蓄積して発症する疾患をシヌクレイノパチーと総称して呼ばれるようになった。

3-2. シヌクレインファミリー シヌクレインという用語は、1988年に α -シヌクレインがシナプス前終末と核に存在するという意味で命名され、最も一般的に使用されている。しかし、シヌクレインの核への局在については、培養細胞やトランスジェニックマウスに過剰発現した場合以外では確認されていない。シヌクレインファミリーは、 α -シヌクレイン、 β -シヌクレイン、 γ -シヌクレインからなる。 α -シヌクレインは、1988年、スタンフォード大学のSchellerらにより、シビレイのシナプス小胞に対する抗体を用いて、シビレイ及びラット脳のcDNAライブラリーよりクローニングされた。¹⁰⁷⁾ このタンパク質の一部であるnon-Amyloid β component (NAC) が、アルツハイマー病の患者脳中のアミロイド中に見出されたこと、¹⁰⁸⁾ 及び家族性パーキンソン病患者の遺伝子上の点突然変異が α -シヌクレイン遺伝子中に見出されたことから、^{109,110)} 神経変性疾患の発症に関与していると考えられるようになった。われわれは、1990年にウシ脳中に特異的に存在する新規タンパク質を見出した。^{111,112)} このタンパク質は、中枢神経系に特異的に発現しており、またリン酸化されていることからPhosphoneuroprotein 14 (PNP14) と命名したが、これが β -シヌクレインである。^{113,114)} β -シヌクレインの精製の成功の原因の1つは、脳のホモジェネートを100°Cに加熱処理したことである。これはカルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンの精製法を真似たもので、本来はカルモジュリン様タンパク質を探索することが目的であった。加熱処理によりプロテアーゼ類が変性し、多くのタンパク質が凝

集して除かれたため、精製が容易になったのであろう。成功のもう1つの原因は、どの組織にも普遍的に存在しているカルモジュリン様のタンパク質の精製が目的であったにもかかわらず、電気泳動のパターンを見て β -シヌクレインは脳に特異的に存在しているのではないかと気が付いたことである。 γ -シヌクレインは、乳癌組織や末梢神経組織に特異的に発現が認められる。^{115—118)}

シヌクレインファミリータンパク質は、3つのドメインから構成されている (Fig. 15)。N末端から中央部までのドメイン1は、親水性アミノ酸に富み、シヌクレインファミリー間で相同性が最も高い。イタリア系アメリカ人家系の家族性パーキンソン病患者で見出された α -シヌクレインの変異Ala30Pro (A30P)、¹¹⁰⁾ 及びドイツ人家系の患者で見出されたAla53Thr (A53T)¹⁰⁹⁾ はドメイン1に存在する。ドメイン2は、中央付近の疎水性領域で、疎水性のアミノ酸に富む。アルツハイマー病患者のアミロイド中に見出されたNACは、この領域に存在する。KTKEGVの繰り返し配列がドメイン1とドメイン2に存在する。ドメイン3は、中央部からC末端部までの酸性アミノ酸に富む領域よりなる。 α -シヌクレインのmRNAの発現は、脳で最も高いが、胎盤、肺、腎臓にも検出される。^{119,120)} β -シヌクレインは、より脳に局在しており、脳以外の組織では精巢に検出され、精子の合成過程への関与が示唆される。^{113,114)} α -及び β -シヌクレインは脳中に比較的少量に存在し、脳の全可溶性タンパク質の、それぞれ、0.05%及び0.1%に達する。¹²⁰⁾ 脳内での分布は、 α -及び β -シヌクレインとも海馬、線条体、梨状皮質に多く、小脳では分子細胞層、ついで顆粒細胞層に多く存在している。^{113,121,122)} α -及び β -シヌクレインとも細胞体には検出されないことから、細胞体で生合成された後、比較的速い軸策輸送により神経終末に運ばれて機能していると考えられる。¹²³⁾

3-3. 線維性封入体の形成 アルツハイマー病の患者脳中のアミロイドの沈着物中に α -シヌクレインの一部であるNACが見出されたこと、及び家族性パーキンソン病患者の遺伝子上の点突然変異が α -シヌクレイン遺伝子中に見出され、しかもパーキンソン病患者の脳中の線維性の封入体であるLewy小体の主構成物が α -シヌクレインであることから、^{124,125)} シヌクレインの生理的機能は繊維性封

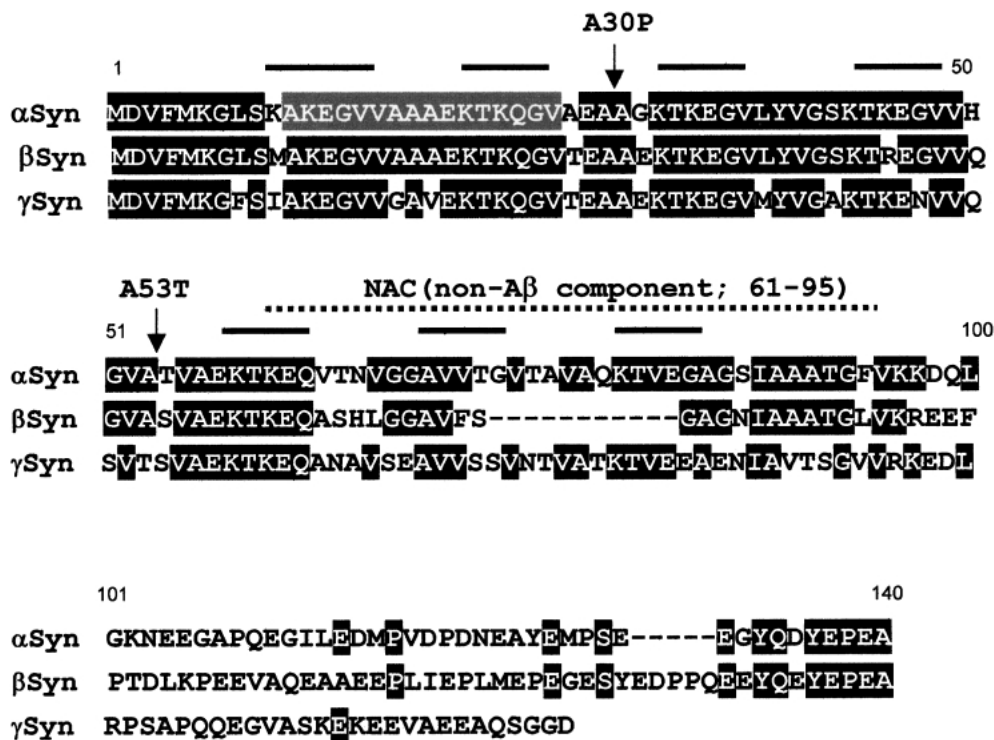


Fig. 15. Amino Acid Sequences of Members of the Synuclein Family

Homologous residues are indicated by white letters on a black background. A black line, —, indicates a repeating motif of (KTKEGV).

入体や凝集物の形成に関与しているであろうと考えられた。実際に、 α -シヌクレインは *in vitro* でも自己凝集性を示す。¹²⁶⁻¹³⁰ 水溶液中ではランダム構造を採る α -シヌクレインが、長時間インキュベートすると β シート構造に富む線維を形成する。¹²⁹ Ala30Pro や Ala53Thr の変異がある α -シヌクレインは、自己凝集性がより強い傾向にあると言う。¹³¹ さらに、 α -シヌクレインの凝集物及び NAC 1-18 ペプチドが培養ヒト神経芽細胞にアポトーシスを誘導することも示された。¹³²

さらにシヌクレインは種々のタンパク質や脂質と結合体を作ることが知られている。 α -シヌクレインと結合するタンパク質には、タウ^{133,134}、14-3-3,¹³⁴ プロテインキナーゼ C,¹³⁴ BAD,¹³⁴ Synphilin-1¹³⁵ が報告されている。これらのうち、14-3-3, BAD やプロテインキナーゼ C は β -シヌクレインとも結合する。¹³⁴ ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞に、 α -シヌクレインの NAC ペプチドと Synphilin-1 を共発現させると、細胞質にエオジン染色性で Lewy 小体様の封入体の出現が観察された。¹³⁵ また、 α -及び β -シヌクレインが、ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ D₂ を阻害する

と言う結果は、シヌクレインの脂質代謝への関与を示唆する。¹³⁶ さらに α -シヌクレインは、負電荷を持つ酸性リン脂質であるフォスファチジルセリンやイノシトールから作られた単層小胞と相互作用し、その結果、 α -シヌクレインの 3% 程度であった α -ヘリックスが 80% に増加する。¹³⁷ また、レコンビナント α -シヌクレインと長鎖不飽和脂肪酸をインキュベートすると、界面活性剤 SDS にも安定な二量体、三量体、四量体等のオリゴマーを時間依存的に形成する。¹³³ この α -シヌクレインのオリゴマーは、 α -シヌクレインのトランスジェニックマウスでも加齢により観察されている。¹³⁸

われわれは、 β -シヌクレインが *in vitro* 及び *in vivo* でリン酸化を受けることを報告した。¹¹⁴ 最近、Fujiwara らは、Lewy 小体型痴呆症患者の脳中の α -シヌクレインが 100% 近くリン酸化されており、リン酸化部位は Ser129 であることを明らかにした。¹³⁹ この Ser129 という部位は、われわれが以前 β -シヌクレイン分子中でカルモデュリンキナーゼ II によりリン酸化されると推測した Ser の部位と一致している。¹¹⁴ しかし、 α -シヌクレインの Ser129 をリン酸化する酵素はカゼインキナーゼ 2 であると

報告されているが,¹³⁹⁾ β -シヌクレインのこの部位の Ser はカゼインキナーゼ 2 ではリン酸化されなかったため、¹⁴⁰⁾ この相違の原因はさらに検討すべきである。興味深いのは、Ser129 がリン酸化された α -シヌクレインは線維を形成し易いと言う。¹³⁹⁾ リン酸化の他に、 α -シヌクレインがニトロ化されていると言う報告¹⁴⁰⁾ もあり、翻訳後修飾と病変との関連はさらに詳しく検討する必要がある。

3-4. 神経変性疾患研究の今後の展望 1997 年に家族性パーキンソン病患者の α -シヌクレイン遺伝子上に点突然変異が報告されると、¹⁴¹⁾ 直ちにその年の 3 月にアメリカの Cold Spring Harbor に世界中のシヌクレインの研究者数人が招待され、シヌクレイン研究の現状を討議する非公開の会合が開かれた。その後のシヌクレイン研究の爆発的な発展とシヌクレイノパチーという新しい臨床概念まで生まれたことを考えると、この会合の主催者が科学的に何が重要なのかを見抜く能力と、タイミングよく研究者を世界中から招待できる融通性のある経済力には感嘆せざるを得ない。

パーキンソン病患者の Lewy 小体中に α -シヌクレインだけが存在し β -シヌクレインが除かれている理由、そしてさらには Lewy 小体中がどのようにして形成されるかを解明することも重要である。最近、Khale らは、 β -シヌクレインは α -シヌクレインの 73 番目から 83 番目までのアミノ酸を欠いているので、 α -シヌクレインからこの部分を欠落させたりコンビナント α -シヌクレインを作成したところ *in vitro* での自己凝集性が失われたことを報告した。¹⁴¹⁾ *In vivo* でもこのペプチドの欠落が原因で β -シヌクレインが Lewy 小体中に存在しないのであろうか。それが証明されれば、シヌクレインによる凝集体形成の機構の解明や、凝集体形成を阻害する神経変性疾患の予防薬の開発が可能になるであろう。

シヌクレインの遺伝子を改変した動物もシヌクレインの機能の解明には必須である。ヒト野生型及び変異型 α -シヌクレインを過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、ドーパミンの減少や運動異常が観察され、さらには神経細胞内封入体の形成が認められる。^{141,142)} しかしながら、 α -シヌクレインのノックアウトマウスでは、線条体でのドーパミン放出の抑制が見られるくらいで顕著な異常は観察されていない。¹⁴³⁾ これは β -シヌクレインにより代償

されている可能性もあり、ダブルノックアウトマウスでの解析が期待される。今後シヌクレイノパチー研究に適したモデル動物が作成され、それが普及すれば、抗神経変性剤の開発に拍車がかかるであろう。

4. 味覚変換物質に関する研究

すっぱいものや水を甘く感じさせる味覚変換剤は、糖尿病や肥満の予防や治療に必要とされている。われわれは、横浜国立大学の栗原良枝教授との共同研究で、横浜国立大学で栽培したミラクルフルーツ (*Richadella dulfica*) の実から、すっぱいものを甘く変えるタンパク質の可溶化に取り組んだ。ちょうど、タイからサルローチ (Sarrochi) 氏が栗原教授の研究室に留学し、昭和大に来て精製を始めた。ミラクルフルーツの活性本体のタンパク質は水で抽出しにくく、これまで精製は難しいと考えられていた。あるとき学生がミラクルフルーツのホモジェネートを間違えてアルカリ性の水溶液を加えてしまい、それを水で洗ったところ、活性本体が水で可溶化できることに気が付いたことが成功につながった。ミラクリンのアミノ酸配列の模式図を Fig. 16 に示す。^{144,146)} しかし、ミラクリン精製の成功の一番の鍵は、アフリカにしか育たなかったミラクルフルーツの木を日本で育ててみようと思った栗原教授の決断であり、いつも感心している点である。その後、マレーシア原産の菓草 *Curculigo Latefolia* の実より甘味タンパク質を精製し、クルクリンと命名した (Fig. 16)。¹⁴⁷⁾ クルクリンはショ糖よりモル単位で比較すると 2 万倍以上甘い。甘味は数分で消失するが、その後、水を甘く感じるようになるのが特徴である。中国雲南省の植物 *Capparis masaikai Levl.* の実からは、熱安定性のマビンリン II を精製した (Fig. 16)。¹⁴⁸⁾ マビンリン II の熱安定性は、ジスルフィド結合により core が形成されていることによると考えられる。¹⁴⁸⁾

これらの甘味タンパク質が味覚変換剤として実用化が可能かどうかは、経済的な点だけが問題である。しかし、ミラクルフルーツの苗木は日本の家庭での栽培用に大量に流通しており、実の価格が低下すればミラクリンの安価な大量精製が可能になるであろう。

5. おわりに

本総説は、昭和大学薬学部中村泰治名誉教授、昭和大学薬学部生物化学教室の中条茂男助教授、分析

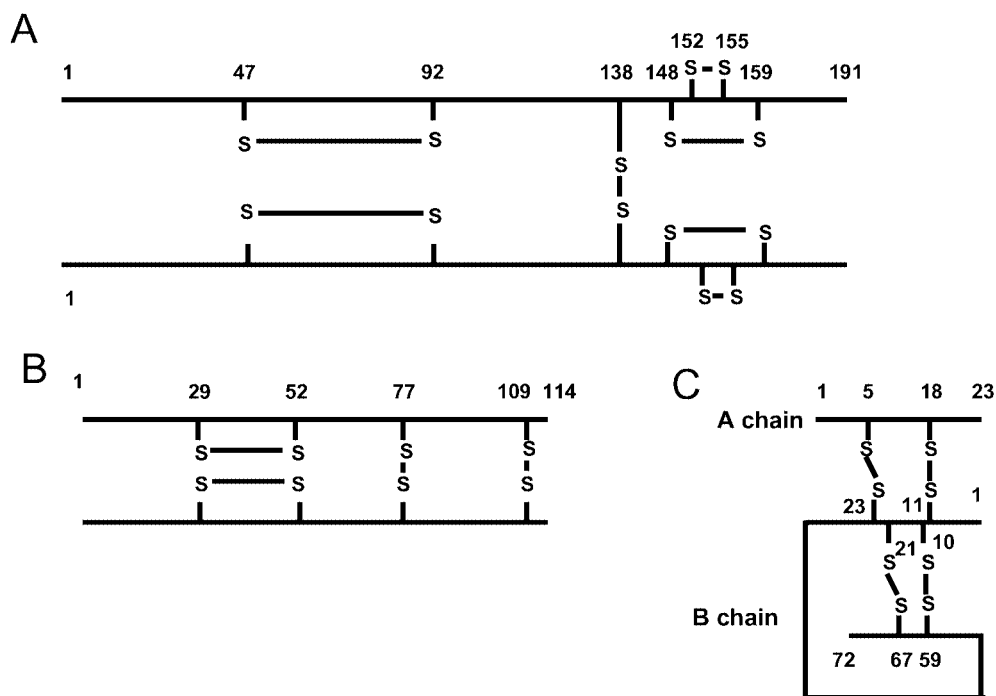


Fig. 16. Structures of Sweetness-Inducing Proteins
A: Miraculin, B: curculin, C: mabinlin II.

センターの相内敏弘助教授，生物化学教室員である今津敏子講師，増田 豊博士，梶本幸子博士，大学院後期課程修了生の平林敬浩博士，渡部正彦博士，川副伸子博士，三原幸織博士，エイエイアイ・ジャパン徐銘博士，東京工業大学萩原啓実助教授，エーザイ株式会社酒井 達博士，生物化学教室の大学院前期課程修了生及び薬学部卒業生を始め，国内並びに海外の大学及び研究所の方々の，御協力，御援助で行われたものです。ここに厚くお礼申しあげます。

REFERENCES AND NOTES

- Present address: Faculty of Applied Life Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, 265-1 Higashizima, Niitsu-shi 956-8603, Japan.
- Ichikawa Y., *J. Cell. Physiol.*, **74**, 223-234 (1969).
- Imaizumi H., Breitman T. R., *Eur. J. Haematol.*, **38**, 289-302 (1987).
- Huang M. E., Ye Y. C., Chen S. R., Chai J. R., Lu J. X., Zhao L., Gu L. J., Wang Z. Y., *Blood*, **72**, 567-572 (1988).
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R., *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257 (1972).
- Kerr J. F. R., Harmon B. V., *Cancer*, **73**, 2013-2026 (1994).
- Carswell E. A., Old L. J., Kassel R. L., Green S., Fiore N., Williamson B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3666-3670 (1975).
- Aggarwal B. B., Kohr W. J., Hass P. E., Moffat B., Spencer S. A., Henzel W. J., Brineman T. S., Nedwin G., Goeddel D. V., Harkins R. N., *J. Biol. Chem.*, **260**, 2345-2354 (1985).
- Arata S., Nakaya K., Furuhashi H., Nakamura Y., Hirayama T., Mashimo J., Kasai N., *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 626-631 (1988).
- Nakaya K., Nakajo S., Shimizu T., Hayashi Y., Nakamura Y., *Biochem. Int.*, **15**, 1213-1219 (1987).
- Takeda K., Iwamoto S., Sugimoto H., Takuma T., Kawatani N., Noda M., Masaki A., Morise H., Arimura H., Konno K., *Nature*, **323**, 338-340 (1986).
- Trinchieri G., Kobayashi M., Rosen M., Loudon R., Murphy M., Perussia B., *J. Exp. Med.*, **164**, 1206-1225 (1986).
- Nakaya K., Kumakawa N., Nakamura Y., *Biochem. Int.*, **10**, 619-626 (1985).

- 14) Nakaya K., Kumakawa N., Iinuma H., Nakamura Y., *Cancer Res.*, **48**, 4201–4205 (1988).
- 15) Sawada S., Okajima S., Aiyama R., Nokata K., Furuta T., Yokokura T., Sugino E., Yamaguchi K., Miyasaka T., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1446–1454 (1991).
- 16) Chou S., Kaneko M., Nakaya K., Nakamura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 160–167 (1990).
- 17) Kaufman S. H., *Cancer Res.*, **49**, 5870–5878 (1989).
- 18) Onishi Y., Azuma Y., Sato Y., Mizumo Y., Tadakuma T., Kizaki H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1175**, 147–154 (1993).
- 19) Solary E., Bertrand R., Kohn K.W., Prommiller Y., *Blood*, **81**, 1359–1368 (1993).
- 20) Mehlen P., Mehlen A., Godet J., Arrigo A. P., *J. Biol. Chem.*, **272**, 31657–31665 (1997).
- 21) Nakaya K., Chou S., Kaneko M., Nakamura Y., *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **82**, 184–191 (1991).
- 22) Jing Y., Hashimoto S., Nakajo N., Nakaya K., *Leukemia Res.*, **18**, 299–304 (1994).
- 23) Jing Y., Nakajo S., Xia L., Nakaya K., Fang Q., Waxman S., Rui Han R., *Leukemia Res.*, **23**, 43–50 (1999).
- 24) Wuerzberger S. M., Pink J. J., Planchon S. M., Byeers K. L., Bornmann W. G., Boothman D. A., *Cancer Res.*, **58**, 1876–1885 (1998).
- 25) Woo R. A., McLure K. G., Lees-Miller S. P., Rancourt D. E., Lee P. W., *Nature*, **394**, 700–704 (1998).
- 26) Chu G., *J. Biol. Chem.*, **269**, 787–790 (1994).
- 27) Konishi A., Shimizu S., Hirota J., Takao T., Fan Y., Matsuoka Y., Zhang L., Yoneda Y., Fujii Y., Skoultchi A. I., Tsujimoto Y., *Cell*, **114**, 673–688 (2003).
- 28) Xu Y., Kajimoto S., Nakajo N., Nakaya N., *Oncology*, **66**, 67–75 (2003).
- 29) Xu Y., Nakaya S., *The Showa University of Medical Sciences*, **14**, 241–247 (2002).
- 30) Zhang L., Nakaya K., Yoshida T., Kuroiwa Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 686–693 (1991).
- 31) Jing Y., Ohizumi H., Kawazoe N., Hashimoto S., Masuda Y., Nakajo S., Yoshida T., Kuroiwa Y., Nakaya K., *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 645–651 (1994).
- 32) Miyaura C., Abe E., Kuribayashi H., Tanaka K., Konno K., Nishii Y., Suda T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 937–943 (1981).
- 33) Numazawa S., Shinoki M., Itoh H., Yoshida T., Kuroiwa Y., *J. Cell Physiol.*, **160**, 113–120 (1994).
- 34) Kawazoe N., Aiuchi T., Masuda Y., Nakajo S., Nakaya K., *J. Biochem.*, **126**, 278–286 (1999).
- 35) Kawazoe N., Watabe M., Masuda Y., Nakajo S., Nakaya K., *Oncogene*, **18**, 2413–2421 (1999).
- 36) Watabe M., Ito K., Masuda Y., Nakajo S., Nakaya K., *Oncogene*, **16**, 779–787 (1998).
- 37) Watabe M., Nakajo S., Yoshida T., Kuroiwa Y., Nakaya K., *Cell Growth and Differen.*, **8**, 871–879 (1997).
- 38) Lin A., Frost J., Deng T., Smeat T., Al-Alawi N., Kikkawa U., Hunter T., Brenner D., Karin M., *Cell*, **70**, 777–789 (1992).
- 39) Fritz G., Kaina B., *Oncogene*, **18**, 1033–1040 (1999).
- 40) Hashimoto S., Jing Y., Kawazoe N., Masuda Y., Nakajo S., Yoshida T., Kuroiwa Y., Nakaya K., *Leukemia Res.*, **21**, 875–883 (1997).
- 41) Watabe M., Masuda Y., Nakajo S., Yoshida T., Kuroiwa Y., Nakaya K., *J. Biol. Chem.*, **271**, 14067–14073 (1996).
- 42) Shen Z. X., Chen G.-Q., Ni G. H., Li X. S., Xiong S. M., Qiu Q. Y., Zhu J., Tang W., Sun G. L., Yang K. Q., Chen Y., Zhou L., Fang Z. W., Wang Y. T., Ma J., Zhang P., Zhang T. D., Chen S. J., Chen Z., Wang Z. Y., *Blood*, **89**, 3354–3360 (1997).
- 43) Shao W., Fenelli M., Ferrara F. F., Riccioni R., Rosenauer A., Davison K., Lamph W. W., Waxman S., Pellicci P. G., Lo Coco F., Avvisati G., Testa U., Peschle C., Gambacorti-Passerini C., Nervi C., Miller Jr. W. H., *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**, 124–133 (1998).
- 44) Iwama K., Nakajo S., Aiuchi T., Nakaya K., *Int. J. Cancer*, **92**, 518–526 (2001).
- 45) Choi J.-H., Ha J., Park J.-H., Lee J. Y., Lee Y. S., Park H.-J., Choi J.-W., Masuda Y., Nakaya K., Lee K.-T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 1327–1333 (2002).

- 46) Cuvillier O., Edsall L., Spiegel S., *J. Biol. Chem.*, **275**, 15691–15700 (2000).
- 47) Baek M. Y., Yoo H. S., Nakaya K., Moon D. C., Lee Y. M., *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 144–149 (2001).
- 48) Wieder T., Orfanos C. E., Geilen C. C., *J. Biol. Chem.*, **273**, 11025–11031 (1998).
- 49) Mentz F., Meerle-Beral H., Ouaz F., Binet J.-L., *Br. J. Haematol.*, **90**, 957–959 (1995).
- 50) Yongkui J., Nakaya K., Rui H., *Anticancer Res.*, **13**, 1049–1054 (1993).
- 51) Higashi K., Ogawara H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1221**, 29–35 (1994).
- 52) Perez-Sala D., Collado-Escobar D., Molideno F., *J. Biol. Chem.*, **270**, 6235–6242 (1995).
- 53) Gibbs J.B., Oiff A., Kohl N.E., *Cell*, **77**, 175–178 (1994).
- 54) Sakai I., Tanaka T., Osawa S., Hashimoto S., Nakaya K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**, 873–879 (1993).
- 55) Ohizumi H., Masuda Y., Nakajo S., Sakai I., Ohsawa S., Nakaya K., *J. Biochem.*, **117**, 11–13 (1995).
- 56) Masuda Y., Yoda M., Ohizumi H., Aiuchi T., Watabe M., Nakajo S., Nakaya K., *Int. J. Cancer*, **71**, 1–7 (1997).
- 57) Masuda Y., Nakaya M., Aiuchi T., Hashimoto S., Nakajo S., Nakaya K., *Leukemia Res.*, **24**, 937–950 (2000).
- 58) Nakajo S., Okamoto M., Masuda Y., Sakai I., Osawa S., Nakaya K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 741–745 (1996).
- 59) Rajotte D., Haddad P., Haman A., Cragoe E. J., Hoang T., *J. Biol. Chem.*, **267**, 9980–9987 (1992).
- 60) Sakai I., Hashimoto S., Yoda M., Ohsawa S., Nakajo S., Nakaya K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 1305–1310 (1994).
- 61) Nishimaki J., Miyazawa K., Yaguchi M., Katagiri T., Kawanishi Y., Toyama K., Ohyashiki K., Hashimoto S., Nakaya K., Takiguchi T., *Leukemia*, **13**, 1399–1405 (1999).
- 62) Yaguchi M., Miyazawa K., Otawa M., Katagiri T., Nishimaki J., Uchida Y., Iwase O., Gotoh A., Kawanishi Y., Toyama K., *Leukemia*, **12**, 1392–1397 (1999).
- 63) Miyazawa K., Nishimaki J., Ohyashiki K., Enomoto S., Kuriya S., Fukuda R., Hotta T., Teramura M., Mizoguchi H., Uchiyama T., Omine M., *Leukemia*, **14**, 1156–1157 (2000).
- 64) Shibayama-Imazu T., Aiuchi T., Nakajo S., Nakaya K., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **129**, 1–11 (2003).
- 65) Kajimoto S., Takanashi N., Kajimoto T., Xu M., Cao J., Masuda Y., Aiuchi T., Nakajo S., Nakaya K., *Int. J. Cancer*, **99**, 879–890 (2002).
- 66) Nakaya K., Miyasaka T., *Anti-cancer Drug*, **14**, 683–693, (2003).
- 67) Umezawa H., Imoto M., Sawa T., Isshiki K., Matsuda N., Uchida T., Inuma H., Hamada M., Takeuchi T., *J. Antibiot. (Tokyo)*, **39**, 170–173 (1986).
- 68) Onoda T., Inuma H., Sasaki Y., Hamada M., Isshiki K., Naganawa H., Takeuchi T., Tatsuta K., Umezawa K., *J. Natl. Prod. (Lloydia)*, **52**, 1252–1257 (1989).
- 69) Yaish P., Gazit A., Gilon C., Levitzki A., *Science*, **242**, 933–935 (1988).
- 70) Hori H., Nagasawa H., Ishibashi M., Uto Y., Hirata A., Saijo K., Ohkura K., Kirk K. L., Uehara Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 3257–3265 (2002).
- 71) Gazit A., Osherov N., Gilon C., Levitzki A., *J. Med. Chem.*, **39**, 4905–4911 (1996).
- 72) Graziani Y., Erikson E., Erikson R. L., *Eur. J. Biochem.*, **135**, 583–589 (1983).
- 73) Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y., *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592–5595 (1987).
- 74) Hanke J. H., Gardner J. P., Dow R. L., Changelian P. S., Brissette W. H., Weringer E. J., Pollok B.A., Connelly P. A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 695–701 (1996).
- 75) Hanke J. H., Gardner J. P., Dow R. L., Changelian P. S., Brissette W. H., Weringer E. J., Pollok B. A., Connelly P. A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 695–701 (1996).
- 76) Bruns C. J., Solorzano C. C., Harbison M. T., Ozawa S., Tsan R., Fan D., Abbruzzese J., Traxler P., Buchdunger E., Radinsky R., Fidler I. J., *Cancer Res.*, **60**, 2926–2935 (2000).
- 77) Wakeling A. E., Guy S. P., Woodburn J.R., *Cancer Res.*, **62**, 5749–5754 (2002).
- 78) Moyer J. D., Barbacci E. G., Iwata K. K.,

- Arnold L., Boman B., Cunningham A., Di-Orio C., Doty J., Morin M. J., Moyer M. P., Neveu M., Pollack V. A., Pustilnik L. R., Reynolds M. M., Sloan D., Theleman A., Miller P., *Cancer Res.*, **57**, 4838–4848 (1997).
- 79) Wakeling A. E., Guy S. P., Woodburn J. R., Ashton S. E., Curry B. J., Barker A. J., Gibson K. H., *Cancer Res.*, **62**, 5749–5754 (2002).
- 80) Rewcastle G. W., Murray D. K., Elliott W. L., Fry D. W., Howard C. T., Nelson J. M., Roberts B. J., Vincent P. W., Showalter H. D., Winters R. T., Denny W. A., *J. Med. Chem.*, **41**, 742–751 (1998).
- 81) Mohammadi M., Froum S., Hamby J. M., Schroeder M. C., Panek R. L., Lu G. H., Eliseenkova A. V., Green D., Schlessinger J., Hubbard S. R., *The EMBO J.*, **17**, 5896–5904 (1998).
- 82) Moasser M. M., Srethapakdi M., Sachar K. S., Kraker A. J., Rosen N., *Cancer Res.*, **59**, 6145–6152 (1999).
- 83) Kraker A. J., Hartl B. G., Amar A. M., Barvi-an M. R., Showalter H. D., Moore C. W., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 885–898 (2000).
- 84) Dorsey J. F., Jove R., Kraker A. J., Wu J., *Cancer Res.*, **60**, 3127–3131 (2000).
- 85) Fabbro D., Ruetz S., Buchdunger E., *Pharmacol. Therap.*, **93**, 79–98 (2002).
- 86) Druker B. J., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G. M., Fanning S., Zimmermann J., Lydon N. B., *Nature Med.*, **2**, 561–566 (1996).
- 87) Buchdunger E., Cioffi C. L., Law N., Stover D., Ohno-Jones S., Druker B. J., Lydon N. B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **295**, 139–145 (2000).
- 88) Heinrich M. C., Griffith D. J., Druker B. J., Wait C. L., Ott K. A., Zigler A. J., *Blood*, **96**, 925–932 (2000).
- 89) Sjoblom T., Shimizu A., O'Brien K. P., Pietras K., Dal Cin P., Buchdunger E., Dumanski J. P., Ostman A., Heldin C. H., *Cancer Res.*, **61**, 5778–5783 (2001).
- 90) Tuveson D. A., Willis N. A., Jacks T., Griffin J. D., Singer S., Fletcher C. D., Fletcher J. A., Demetri G. D., *Oncogene*, **20**, 5054–5058 (2000).
- 91) Laird A. D., Vajkoczy P., Shawver L. K., Thurnher A., Liang C., Mohammadi M., Schlessinger J., Ullrich A., Hubbard S. R., Blake R. A., Fong T. A., Strawn L. M., Sun L., Tang C., Hawtin R., Tang F., Shenoy N., Hirth K. P., McMahon G., Cherrington J. M., *Cancer Res.*, **60**, 4152–4160 (2000).
- 92) Fong T. A., Shawver L. K., Sun L., Tang C., App H., Powell T. J., Kim Y. H., Schreck R., Wang X., Risau W., Ullrich A., Hirth K. P., McMahon G., *Cancer Res.*, **59**, 99–106 (1999).
- 93) Uehara Y., Murakami Y., Suzukake-Tsuchiya K., Moriya Y., Sano H., Shibata K., Omura S., *J. Antibiot. (Tokyo)*, **41**, 831–834 (1988).
- 94) Cassinelli G., Lanzi C., Pensa T., Gambetta R. A., Nasini G., Cuccuru G., Cassinis M., Pratesi G., Polizzi D., Tortoreto M., Zunino F., *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 1539–1547 (2000).
- 95) Sankawa U., Ebizuka Y., Miyazaki T., Isomura Y., Otsuka H., Shibata S., Inomata M., Fukuoka F., *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2392–2395 (1977).
- 96) Hashimoto S., Xu M., Masuda Y., Aiuchi T., Nakajo S., Cao J., Miyakoshi M., Ida Y., Nakaya K., *J. Biochem.*, **125**, 17–23 (1999).
- 97) Kajimoto S., Xu Y., Cao J., Masuda Y., Aiuchi T., Akajo S., Ehara Y., Shibuya M., Amori T., Nakaya K., *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 944–951 (2002).
- 98) Masuda Y., Nishida A., Hori K., Hirabayashi T., Kajimoto S., Nakajo S., Kondo T., Asaka M., Nakaya K., *Oncogene*, **22**, 1012–1023 (2003).
- 99) Sunkel C. E., Glover D. M., *J. Cell Sci.*, **89**, 25–38 (1988).
- 100) Cogswell J. P., Brown C. E., Bisi J. E., Neill S. D., *Cell Growth Differ.*, **11**, 615–623 (2000).
- 101) Gorre M. E., Mohammed M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., Rao P. N., Sawyers C. L., *Science*, **293**, 876–880 (2001).
- 102) Huang M., Dorsey J. F., Epling-Burnette P. K., Nimmanapalli R., Landowski T. H., Mora L. B., Niu G., Sinibaldi D., Bai F., Kraker A., Yu H., Moscinski L., Wei S., Djeu J., Dalton W. S., Bhalla K., Loughran T. P., Wu J., Jove R., *Oncogene*, **21**, 8804–8816 (2002).
- 103) Nagar B., Bornmann W. G., Pellicena P.,

- Schindler T., Veach D. R., Miller W. T., Clarkson B., Kuriyan J., *Cancer Res.*, **62**, 4236–4243 (2002).
- 104) Xu Y., Kajimoto S., Nakajo S., Nakaya K., *Oncology*, (2003) (in press).
- 105) Kelly L. M., Yu J. C., Boulton C. L., Apatira M., Li J., Sullivan C. M., Williams I., Amaral S. M., Curley D. P., Duclos N., Neuberg D., Scarborough R. M., Pandey A., Hollenbach S., Abe K., Lokker N. A., Gilliland D. G., Giese N. A., *Cancer Cell*, **1**, 421–432 (2002).
- 106) Weisberg E., Boulton C., Kelly L. M., Manley P., Fabbro D., Meyer T., Gilliland D. G., Griffin J. D., *Cancer Cell*, **1**, 433–443 (2002).
- 107) Maroteaux L., Campanelli J. T., Sceller R. H., *J. Neurochem.*, **8**, 2804–2815 (1988).
- 108) Ueda K., Fukushima H., Masliah E., Xia Y., Iwai A., Yoshimoto M., Otero D. A., Kondo J., Ihara Y., Saitoh T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 11282–11286 (1993).
- 109) Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Leroy E., Ide S. E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E. S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W. G., Lazzarini A. M., Duvoisin R. C., Di Iorio G., Golbe L. I., Nussbaum R. L., *Science*, **276**, 2045–2047 (1997).
- 110) Kruger R., Kuhn W., Muller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek H., Epplen J. T., Schols L., Riess O., *Natl. Genet.*, **18**, 106–108 (1998).
- 111) Nakajo S., Obata K., Aiuchi T., Shibayama T., Okahashi I., Ochiai H., Nakai Y., Nakaya K., Nakamura Y., *J. Neurochem.*, **55**, 2031–2038 (1990).
- 112) Tobe T., Nakajo S., Tanaka A., Mitoya A., Omata K., Nakaya K., Tomita M., Nakamura Y., *J. Neurochem.*, **59**, 1624–1629 (1992).
- 113) Shibayama-Imazu T., Okahashi I., Omata K., Nakajo S., Ochiai H., Nakai Y., Hama T., Nakamura Y., Nakaya K., *Brain Res.*, **622**, 17–25 (1993).
- 114) Nakajo S., Tsukada K., Omata K., Nakamura Y., Nakaya K., *Eur. J. Biochem.*, **217**, 1057–1063 (1993).
- 115) Akopian A. N., Wood J. N., *J. Biol. Chem.*, **270**, 21264–21270 (1995).
- 116) Ji H., Liu Y. E., Jia T., Wang M., Liu J., Xiao G., Joseph B. K., Rosen C., Shi Y. E., *Cancer Res.*, **57**, 759–764 (1997).
- 117) Buchman V. L., Adu J., Pinon L. G., Ninkina N. N., Davies A. M., *Nature Neurosci.*, **1**, 101–103 (1998).
- 118) Buchman V. L., Hunter H. J., Pinon L. G., Thompson J., Privalova E. M., Ninkina N. N., Davies A. M., *J. Neurosci.*, **18**, 9335–9341 (1998).
- 119) Jakes R., Spillantini M. G., Goedert M., *FEBS Lett.*, **345**, 27–32 (1994).
- 120) Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M., Ge N., Flanagan L., de Silva H. A., Kittel A., Saitoh T., *Neuron*, **14**, 467–475 (1995).
- 121) Nakajo S., Tsukada K., Kameyama H., Furuyama Y., Nakaya K., *Brain Res.*, **741**, 180–184 (1996).
- 122) Nakajo S., Shioda S., Nakai Y., Nakaya K., *Mol. Brain Res.*, **27**, 81–86 (1994).
- 123) Jensen P. H., Nielsen M. S., Jakes R., Dotti C. G., Goedert M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 26292–26294 (1998).
- 124) Spillantini M. G., Schmidt M. L., Lee V. M.-Y., Trojanowski J. Q., Jakes R., Goedert M., *Nature*, **388**, 839–840 (1997).
- 125) Baba M., Nakajo S., Tu P.-H., Tomita T., Nakaya K., Lee V. M.-Y., Trojanowski J., Iwatsubo T., *Am. J. Pathol.*, **152**, 879–884 (1998).
- 126) Crowther R. A., Jakes R., Spillantini M. G., Goedert M., *FEBS Lett.*, **436**, 309–312 (1998).
- 127) Conway K. A., Harper J. D., Lansbury P. T., *Natl. Med.*, **4**, 1318–1320 (1998).
- 128) Hashimoto M., Hsu L. J., Sisk A., Xia Y., Takeda A., Sundsmo M., Masliah E., *Brain Res.*, **799**, 301–306 (1998).
- 129) El-Agnaf O. M., Jakes R., Curran M. D., Middleton D., Ingenito R., Bianchi E., Pessi A., Neill D., Wallace A., *FEBS Lett.*, **440**, 67–70 (1998).
- 130) Giasson B. I., Uryu K., Trojanowski J. Q., *J. Biol. Chem.*, **274**, 7619–7622 (1999).
- 131) Conway K. A., Lee S. J., Rochet J. C., Ding T. T., Williamson R. E., Lansbury Jr. P. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 571–576 (2000).
- 132) El-Agnaf O. M. A., Jakes R., Curran M. D., *FEBS Lett.*, **440**, 71–75 (1998).

- 133) Jensen P. H., Hager H., Nielsen M. S., Hojrup P., Gliemann J., Jakes R., *J. Biol. Chem.*, **274**, 25481–25489 (1999).
- 134) Ostrerova N., Petrucelli L., Farrer M., Mehta N., Choi P., Hardy J., Wolozin B., *J. Neurosci.*, **19**, 5782–5791 (1999).
- 135) Engelender S., Kaminsky Z., Guo X., Sharp A. H., Amaravi R. K., Kleiderlein J. J., Margolis R. L., Troncoso J. C., Lanahan A. A., Worley P. F., Dawson V. L., Dawson T. M., Ross C. A., *Natl. Genet.*, **22**, 110–114 (1999).
- 136) Jenco J. M., Rawlingson A., Daniels B., Morris A. J., *Biochemistry*, **37**, 4901–4909 (1998).
- 137) Davidson W. S., Jonas A., Clayton D. F., George J. M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 9443–9449 (1998).
- 138) Sharon R., Bar-Joseph I., Frosch M. P., Walsh D. M., Hamilton J. A., Selkoe D. J., *Neuron*, **37**, 583–595 (2003).
- 139) Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N., Kawashima A., Masliah E., Goldberg M. S., Shen J., Takio K., Iwatsubo T., *Natl. Cell Biol.*, **4**, 160–164 (2002).
- 140) Giasson B. I., Duda J. E., Murray V. J., Chen Q., Souza J. M., Hurtig H. I., Ischiropoulos H., Trojanowski J. Q., Lee V. M.-Y., *Science*, **290**, 985–989 (2000).
- 141) Kahle P. J., Neumann M., Ozmen L., Muller V., Odoy S., Okamoto N., Jacobsen H., Iwatsubo T., Trojanowski J. Q., Takahashi H., Wakabayashi K., Bogdanovic N., Riederer P., Kretzschmar H. A., Haass C., *Am. J. Pathol.*, **159**, 2215–2225 (2001).
- 142) Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., Mallory M., Hashimoto M., Takeda A., Sagara Y., Sisk A., Mucke L., *Science*, **287**, 1265–1269 (2000).
- 143) Abeiliovich A., Schmitz Y., Farinas I., Choi-Lundberg D., Ho W.-H., Castillo P. E., Shinsky N., Verdugo J. M. G., Armanini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A., *Neuron*, **25**, 239–253 (2000).
- 144) Theerasilp S., Nakajo S., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y., *J. Biol. Chem.*, **264**, 6655–6659 (1989).
- 145) Igeta H., Tamura Y., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1079**, 303–307 (1991).
- 146) Masuda Y., Nirasawa S., Nakaya K., Kurihara Y., *Gene*, **161**, 175–177 (1995).
- 147) Yamashita H., Theerasilp S., Aiuchi T., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y., *J. Biol. Chem.*, **265**, 15770–15775 (1990).
- 148) Liu X., Maeda S., Hu Z., Aiuchi T., Nakaya K., Kurihara Y., *Eur. J. Biochem.*, **211**, 281–287 (1993).